



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAzione
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

| | |
|------------------------------|-----------------|
| DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO | 102009901736381 |
| Data Deposito | 28/05/2009 |
| Data Pubblicazione | 28/11/2010 |

Classifiche IPC

Titolo

ESPRESSIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

DESCRIZIONE

[01] La presente invenzione si riferisce generalmente alla produzione di proteine ricombinanti. In particolare, l'invenzione si riferisce alla produzione di proteine ricombinanti in un sistema di 5 attivazione di auto-induzione.

SFONDO DELL'INVENZIONE

[02] L'utilizzo di espressione di gene ricombinante per la produzione industriale di proteine sin dai primi anni '70 è diventato una industria multi-miliardaria. Le proteine possono essere prodotte in 10 maniera ricombinante facendo uso del macchinario di espressione derivato da una cellula ospite. Anche se l'espressione di proteina può avvenire in vitro, vengono utilizzate comunemente cellule ospiti come fabbriche per l'espressione di gene ricombinante. Esempi di ospiti adeguati includono batteri, come il batterio gram-negativo *Escherichia* 15 *coli*, cellule ospiti di animale (per esempio, cellule ospiti di mammifero o di insetto) e lieviti. Tuttavia, nonostante la profonda conoscenza della genetica e della biologia molecolare di *E. coli* e di altre cellule ospiti, ottenere una produzione di proteina efficiente (per esempio, su scala industriale) può essere difficoltoso, e sussiste una necessità di fornire 20 sistemi di espressione in grado di regolare e controllare l'espressione di proteina in modo tale che la proteina ricombinante venga prodotta al momento giusto durante la coltura di cellula ospite.

[03] Dopo molti anni di ricerche intense, sono emerse alcune "regole" empiriche che possono guidare la progettazione di 25 sistemi di espressione in *E. coli*. Tra queste, la stretta regolazione della

attività di promotore può permettere un periodo iniziale veloce di crescita cellulare a densità elevata. Una volta ottenuta una densità ottimale, l'espressione di proteina può essere innescata attraverso attivazione inducibile del promotore, utilizzando un induttore (un sistema noto come espressione inducibile). Tuttavia, vi sono problemi associati a questo approccio. Il costo di induttori, in particolare quando utilizzati su scala industriale, può essere molto elevato. Inoltre, alcuni promotori inducibili possono influenzare la crescita cellulare e possono essere incompatibili con il successivo utilizzo delle proteine espresse in esseri umani o animali. In aggiunta a quanto sopra, l'utilizzo di un promotore inducibile richiede l'aggiunta attiva dell'induttore alla coltura batterica, incrementando la possibilità di contaminare la coltura ed aggiungendo un ulteriore componente che necessita di essere rimosso durante una successiva purificazione della proteina ricombinante.

[04] L'utilizzo di sistemi di espressione di auto-induzione per la produzione di proteina ricombinante è stato considerato come soluzione per eliminare la necessità di monitorare la crescita cellulare ed aggiungere attivamente l'induttore durante la crescita. In questi sistemi, l'auto-induzione può essere determinata, per esempio, da cambiamenti metabolici durante la crescita della cellula ospite. Sistemi di auto-induzione basati rispettivamente sull'utilizzo di elementi regolatori dell'operone lac (per esempio, promotore T7lac) e la crescita diauxica sono stati descritti in US2004/0180426. Nel sistema diauxico descritto in US2004/0180426, il terreno contiene glucosio, glicerolo e lattosio. Il glucosio viene utilizzato come fonte di carbonio durante la

fase di crescita ed allo stesso tempo agisce come repressore catabolico del promotore T7lac. Quando il glucosio viene esaurito, viene utilizzato il glicerolo come fonte di carbonio. Inoltre, in assenza di glucosio, viene innescato l'assorbimento di lattosio ed il lattosio che entra nella cellula 5 ospite serve ad attivare il promotore T7lac, stimolando in tal modo l'espressione del gene. Un sistema simile fa uso di glucosio e propionato e l'auto-induzione viene innescata attraverso l'attivazione indotta da propionato del promotore di prpBCDE di *E. coli* inducibile da propionato, descritta precedentemente (Lee SK e Keasling JD. 10 Protein Expr Purif. 2008 61:197-203).

[05] Tuttavia i sistemi di auto-induzione descritti sopra si basano su fonti esogene di auto-induttore (vale a dire, lattosio e propionato rispettivamente) che deve essere aggiunto all'inizio della coltura di cellula ospite. Sussiste una necessità di sviluppare un 15 sistema di auto-induzione efficace, autonomo che non si basa sull'aggiunta di un auto-induttore. Inoltre, sussiste una necessità di controllare in maniera efficiente l'espressione genica fino a quando la coltura di cellula ospite ha raggiunto un livello che permetterà la massima efficienza di produzione di proteina.

20 [06] Il sistema di *Quorum Sensing* (QS) è un sistema naturale basato su una forma di comunicazione cellula-cellula. Il sistema di QS è stato descritto per la prima volta negli anni '70 per il batterio marino *Vibrio fischeri*. Esso è diffuso tra i batteri. Batteri aventi un sistema di QS possono rilevare la densità della loro popolazione. Il 25 sistema di QS si basa sul rilascio di un auto-induttore da parte delle

cellule nel terreno. Le cellule rispondono a concentrazioni di soglia dell'autoinduttore che possono essere raggiunte solamente ad una determinata densità cellulare (un "quorum"). Una volta raggiunta questa concentrazione di soglia, viene attivata una cascata di eventi di 5 trasduzione del segnale che ha come risultato l'attivazione di geni bersaglio sotto il controllo del macchinario di QS. Questo sistema può anche permettere l'amplificazione dell'auto-induttore stesso in un ciclo di retroazione positivo, mediante un meccanismo di auto-regolazione. Sino ad ora sono stati descritti tre tipi di sistema di QS in batteri Gram 10 negativi e/o batteri Gram positivi sulla base della natura dell'auto-induttore (Tipi da I a III). Il tipo I è stato trovato fino ad ora in batteri Gram negativi ed utilizza acil-omoserina lattone come auto-induttore. Un sistema di tipo I che è stato descritto in dettaglio è il sistema di QS da *Vibrio fischeri* (Kaplan e Greenberg, 1985 J bacteriol., 163:1210- 15 1214).

[07] Geni luminescenti di *V. fischeri* vengono attivati mediante sistema di QS in una regolazione a retroazione positiva. I geni di *lux* vengono trascritti da due operoni divergenti; l'operone di sinistra contiene il gene di *luxR* che codifica per la proteina regolatoria LuxR, e 20 l'operone di destra contiene almeno 6 geni (*luxICDABE*). I due operoni sono separati da una regione regolatoria comune. Il gene *luxI* codifica per una sintesi di auto-induttore (LuxI) che produce l'auto-induttore noto come N-(3-ossoesanoil)-omoserina lattone (HSL). LuxR si lega a HSL ed il complesso agisce come un complesso di auto-induttore, 25 LuxR/HSL, che si lega ad un promotore inducibile (Box di lux in

promotore di *luxI*, P_{luxI}) posizionato a monte dell'operone di *luxICDABE*. Il legame di LuxR/HSL a questo promotore attiva la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi di luciferasi attivando anche la trascrizione di *luxI*, funzionando in tal modo per incrementare la produzione di HSL in un 5 ciclo di retroazione positivo. LuxR/HSL si lega anche al promotore di *luxR* che ne regola la sintesi (March e Bentley, Curr Opin Biotechnol. 2004 15:495-502). I geni del sistema di QS naturale sono stati espressi in *E. coli*, ed i suoi componenti sono stati utilizzati per dimostrare la comunicazione cellula-cellula in questo ospite (Engebrecht, Cell 1983, 10 32: 773-781; Devine *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 86:5688-92).

[08] Alcuni elementi regolatori del sistema di QS da *V. fischeri* sono stati utilizzati per la produzione ricombinante di determinate proteine in un sistema di espressione inducibile. Il brevetto U.S. 5,196,318, descrive un sistema di espressione che contiene un 15 gene di *luxR* intatto ed un gene di interesse operativamente collegato al promotore di *luxI*. L'espressione del gene di interesse viene attivata mediante l'aggiunta di auto-induttore esogeno (HSL).

[09] Un problema con il sistema di QS descritto sopra è che esso richiede l'aggiunta di un auto-induttore esogeno. Sussiste una 20 necessità di fornire un sistema di auto-induzione indipendente da tali aggiunte alla coltura di cellula ospite e che inneschi autonomamente l'espressione genica al livello desiderato e durante la giusta fase di coltura cellulare.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[10] L'invenzione fornisce proteine di LuxR mutanti isolate. Preferibilmente le proteine di LuxR mutanti hanno attività regolatoria migliorata rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico. In alcune forme di realizzazione le proteine di LuxR mutanti hanno una sequenza amminoacidica C-terminale estesa rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico. La sequenza amminoacidica C-terminale può essere estesa di tra circa 5 e circa 20 amminoacidi (per esempio, di 6 amminoacidi o di 15 amminoacidi in lunghezza rispetto alla proteina di LuxR di tipo selvatico). In alcune forme di realizzazione la sequenza amminoacidica C-terminale estesa è VKYVSKA (amminoacidi 250-256 di SEQ ID NO:72) o VKYVSKAKGNSTTLD (amminoacidi 250-264 di SEQ ID NO:75). In altre forme di realizzazione le proteine di LuxR mutanti hanno una sequenza amminoacidica C-terminale troncata. In alcune di queste forme di realizzazione le proteine di LuxR mutanti hanno una sequenza amminoacidica C-terminale che è troncata solamente di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 amminoacidi in lunghezza rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico numerata secondo SEQ ID NO:42. In altre forme di realizzazione le proteine di LuxR mutanti comprendono un'alterazione amminoacidica in corrispondenza di una o più posizioni amminoacidiche 8-20, in cui le posizioni amminoacidiche sono numerate secondo SEQ ID NO:42 (per esempio, un'alterazione amminoacidica alla posizione D8; vedere SEQ ID NO:73).

[11] L'invenzione fornisce anche molecole di acido nucleico isolate che codificano per proteine di LuxR mutanti dell'invenzione (per esempio, SEQ ID NOS:144-149).

[12] In altre forme di realizzazione l'invenzione fornisce molecole di acido nucleico isolate che comprendono una sequenza nucleotidica che codifica per una proteina di LuxI di *V. fischeri* o una proteina di LuxR di *V. fischeri*, in cui la sequenza nucleotidica è 5 ottimizzata per l'espressione in *E. coli*, come quelle mostrate in SEQ ID NOS:78-97, 133, e 134.

[13] L'invenzione fornisce vettori di espressione. In alcune forme di realizzazione i vettori di espressione comprendono molecole di acido nucleico isolate che codificano per proteine mutanti di LuxR dell'invenzione. In altre forme di realizzazione i vettori di espressione comprendono un primo gene operativamente collegato ad un primo promotore, in cui il primo inducibile viene indotto da un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore; ed un secondo gene operativamente collegato ad un secondo promotore, in cui il secondo promotore non viene indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore ed in cui l'espressione del secondo gene interferisce con l'espressione del primo gene. Il primo gene può codificare per una proteina tipo LuxR o esso può codificare per una proteina di interesse. In alcune forme di realizzazione questi vettori di espressione 20 comprendono un terzo promotore operativamente collegato ad un terzo gene che codifica per una proteina tipo LuxI (per esempio, LuxI) e, se il primo gene codifica per una proteina di interesse, può anche comprendere un quarto promotore operativamente collegato ad un quarto gene codificante per una proteina tipo LuxR. In una qualsiasi di 25 queste forme di realizzazione la proteina tipo LuxR può essere LuxR o

una proteina di LuxR mutante dell'invenzione, e le sequenze codificanti possono essere ottimizzate per l'espressione in *E. coli*.

[14] In altre forme di realizzazione l'invenzione fornisce vettori di espressione che comprendono un primo gene che codifica per 5 una proteina tipo LuxI (per esempio, LuxI) operativamente collegato ad un primo promotore; un secondo gene che codifica per una proteina tipo LuxR operativamente collegato ad un secondo promotore; un terzo gene che codifica per una proteina di interesse operativamente collegato ad un terzo promotore che viene indotto da un complesso di proteina 10 tipo LuxR/auto-induttore; ed un gene repressore operativamente collegato ad un quarto promotore che è inducibile ma che non è indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore, in cui l'espressione del gene repressore interferisce con l'espressione di *luxR*. In una qualsiasi di queste forme di realizzazione la proteina tipo LuxR può 15 essere LuxR o una proteina di LuxR mutante dell'invenzione, e le sequenze codificanti possono essere ottimizzate per l'espressione in *E. coli*.

[15] L'invenzione fornisce cellule ospiti isolate che comprendono vettori di espressione dell'invenzione. In altre forme di 20 realizzazione l'invenzione fornisce cellule ospiti isolate che comprendono un gene eterologo selezionato dal gruppo consistente in un primo gene che codifica per una proteina tipo LuxI (per esempio, LuxI) ed un secondo gene che codifica per una proteina tipo LuxR (per esempio, LuxR o una proteina di LuxR mutante dell'invenzione, in cui il gene 25 eterologo è stabilmente integrato nel genoma della cellula ospite isolata.

In forme di realizzazione in cui la cellula ospite comprende un gene stabilmente integrato che codifica per la proteina tipo LuxI, il gene che codifica per la proteina tipo LuxR può essere stabilmente integrato nel genoma della cellula ospite isolata o esso può essere fornito su un 5 vettore di espressione. Cellule ospiti dell'invenzione possono comprendere un vettore di espressione che comprende un gene di interesse operativamente collegato ad un promotore inducibile, in cui il promotore inducibile viene indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore. In una qualsiasi di queste forme di realizzazione, 10 qualsiasi gene può essere ottimizzato per l'espressione in *E. coli*.

[16] In altre forme di realizzazione l'invenzione fornisce cellule ospiti isolate che comprendono un gene eterologo che codifica per una proteina tipo LuxR; ed un vettore di espressione che codifica per un gene di interesse operativamente collegato ad un promotore che 15 viene indotto da un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore. Il gene eterologo può essere presente in un vettore di espressione o può essere integrato stabilmente nel genoma della cellula ospite. Il gene eterologo può, per esempio, codificare per LuxR o una proteina di LuxR mutante dell'invenzione. Il gene eterologo o il gene di interesse possono 20 essere ottimizzati per l'espressione in *E. coli*.

[17] L'invenzione fornisce metodi per esprimere un gene di interesse in una cellula ospite dell'invenzione. La cellula ospite viene coltivata in condizioni che permettono l'espressione del gene di interesse. Il metodo può comprendere la preparazione di inoculo di una 25 cellula ospite che comprende un vettore di espressione comprendente (i)

un primo gene eterologo di interesse operativamente collegato ad un primo promotore che risponde ad induzione da parte del complesso di auto-induttore di LuxR; e (ii) un secondo promotore inducibile che guida l'espressione di un secondo gene in modo tale che l'espressione del
5 secondo gene interferisca con l'espressione del gene eterologo, ed in cui la soppressione del gene di interesse durante la fase di inoculo viene conseguita inducendo l'attivazione del secondo promotore inducibile. L'inoculo viene utilizzato per preparare una coltura della cellula ospite. La proteina ricombinante espressa dal gene di interesse può essere
10 purificata e, se desiderato, formulata in una composizione farmaceutica (per esempio, una composizione di vaccino).

[18] L'invenzione fornisce proteine ricombinanti prodotte come descritto qui, così come composizioni farmaceutiche che comprendono le proteine ricombinanti (per esempio, composizioni di
15 vaccino).

[19] L'invenzione fornisce anche metodi per ottimizzare l'espressione di geni di *luxI* o *luxR* di *V. fischeri*. Il metodo comprende ottenere una sequenza nucleotidica che codifica per LuxI o LuxR; e modificare la sequenza polinucleotidica per ottimizzare l'uso di codone
20 in *E. coli*.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[20] **FIG. 1.** Frammento di operone di Lux amplificato da DNA genomico di *V. fischeri* ATCC7744.

[21] **FIG. 2.** vettore pGllux506.

[22] **FIG. 3.** Schema per la costruzione dei vettori pLAIR32 e pLAIET32.

[23] **FIGG. 4A-B. FIG. 4A,** Organizzazione dei due promotori convergenti PT7 e *PluxR*. **FIG. 4B,** l'induzione del promotore di T7 in ceppo BL21DE3 che è stato cresciuto su LB agar con IPTG 1mM ha represso l'espressione di *luxR*, e così il sistema di auto-induzione e conseguentemente l'espressione di proteina di Gfp.

[24] **FIGG. 5A-B.** Ottimizzazione dell'uso di codone nel gene di *luxI*. **FIG. 5A,** sequenza originale; **FIG. 5B,** sequenza ottimizzata.

[25] **FIGG. 6A-B.** Ottimizzazione dell'uso di codone nel gene di *luxR*. **FIG. 6A,** sequenza originale; **FIG. 6B,** sequenza ottimizzata..

[26] **FIGG. 7A-B.** Vettore di espressione pMKSaL. **FIG. 7A,** caratteristiche principali di vettore pMKSaL; **FIG. 7B,** caratteristiche dei siti di clonaggio multipli.

[27] **FIG. 8.** Espressione del gene di *gfp* dal pLAI-GFP e pMKSaL-GFP nel sistema di auto-induzione. pMKSaL ha ospitato le sequenze ottimizzate dei geni di *luxR* e *luxI*. pLAI(-) è il controllo negativo e non ha il gene di *gfp*.

[28] **FIG. 9.** Ottimizzazione del "frammento di operone di lux" (*luxR*, *luxI*, elemento che agisce in cis tra questi due geni) mediante PCR propensa all'errore. Esempi di cloni aventi una espressione di fluorescenza da gene reporter di *gfp* con un comportamento di Quorum sensing.

[29] **FIGG. 10A-C.** Caratterizzazione molecolare di ceppo MM294.1::lux. **FIG. 10A**, prodotto di PCR utilizzando i primer LuxI4Fr\LuxI4Rv e DNA genomico di MM294.1 come tempiato (corsia 1: controllo negativo, corsia 2: DNA plasmidico di pGLLux506 di controllo positivo, corsia 3: DNA genomico di MM294.1::luxI). **FIG. 10B**, Southern Blotting utilizzando il frammento di PCR descritto in **FIG. 10A** come sonda, In corsie 1 e 2 prodotto di PCR come in **FIG. 10A**, corsia 3 DNA plasmidico di pGLEM-luxI, corsia 4 DNA genomico di MM294.1::luxI, corsia 5 DNA genomico di MM294.1. Il DNA è stato gerito con enzimi di restrizione XmaI e AatII. **FIG. 10C**, cassetta di *luxI* in DNA genomico di MM294.1.

[30] **FIG. 11.** Vettore pMKSaI-ΔluxI.

[31] **FIG. 12A.** Differenti combinazioni di plasmide/ceppo ospite per testare l'espressione della proteina di Gfp. **FIG. 12B**, le colture cellulari sono state normalizzate mediante crescita in pre-coltura fino alla saturazione e quindi diluite in terreno fresco. La fluorescenza di proteina di Gfp è stata misurata durante la crescita cellulare.

[32] **FIG. 13.** Rappresentazioni di proteine di LuxR di tipo selvatico e mutate.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

[33] La presente invenzione fornisce sistemi per esprimere proteine ricombinanti di interesse. Un vantaggio di questi sistemi è che essi non si basano su un'attivazione esogena ma sono auto-inducibili. Pertanto, invece di accendere l'espressione genica

attraverso l'aggiunta di un induttore esogeno, l'invenzione consente ad una cellula ospite di generare una fonte endogena di un induttore in una maniera controllata, in modo tale che l'espressione di gene ricombinante venga innescata in una fase desiderata della coltura di 5 cellula ospite (ed ad una densità di cellula ospite desiderata). L'aspetto auto-inducibile viene raggiunto utilizzando elementi del sistema di quorum sensing (QS) di batteri, in particolare di batteri Gram negativi come *Vibrio fischeri* (geni di bioluminescenza lux), *Pseudomonas aeruginosa* (geni di virulenza), *Agrobacterium tumefaciens* (trasferimento 10 coniugale), *Serratia liquefaciens* (motilità a sciame), e *Erwinia caratovora* (produzione di antibiotico), per esempio. Vedere Fuqua e Greenberg, Curr. Opinion Microbiol. 1: 183 189, 1998; e Fuqua *et al.*, Ann. Rev. Microbiol. 50:727 751, 1996).

[34] Il termine "gene" come utilizzato qui, significa una 15 sequenza codificante per una proteina. Essa può comprendere, ma non necessariamente, elementi trovati in e/o associati con un gene che codifica per quella proteina in natura (*per esempio*, introni ed elementi regolatori). Un "gene eterologo" è un gene da un organismo differente dalla cellula ospite in cui esso è contenuto. Una "proteina eterologa" è 20 una proteina prodotta da un gene eterologo.

Macchinario di Quorum Sensing

[35] Anche se l'invenzione non è limitata all'utilizzo del macchinario di QS di *V. fischeri*, questo sistema viene descritto qui per illustrare aspetti dell'invenzione.

[36] I geni di bioluminescenza *lux* di *V. fischeri* vengono attivati mediante QS attraverso una regolazione di retroazione positiva. I geni di *lux* vengono trascritti da due operoni divergenti che sono separati da una regione regolatoria comune. L'operone di sinistra 5 contiene il gene di *luxR* che codifica per la proteina regolatoria LuxR. L'operone di destra contiene almeno 6 geni (*luxICDABE*). Il gene *luxI* codifica per una sintetasi di induuttore (LuxI) che produce l'auto-induttore N-(3-ossoesanoil)-omoserina lattone (HSL; anche conosciuto come AHL e come VAI-1). LuxR si lega ad HSL, ed il complesso 10 LuxR/HSL (anche riferito qui come un "complesso di LuxR-auto-induttore") si lega a monte dell'operone di *luxICDABE*, cosa che permette la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi di luciferasi come anche una trascrizione esponenziale di *luxI* in un ciclo di retroazione positiva. LuxR si lega anche al promotore di *luxR*, cosa che inibisce la 15 sintesi di LuxR (March and Bentley, Curr Opin Biotechnol. 2004 15:495-502). Il gene di *luxR* viene anche controllato positivamente dal complesso cAMP/CRP (proteina di recettore di cAMP), che si lega al box di CRP presente nella regione regolatoria comune. Il sistema di QS viene anche regolato mediante repressione catabolica. I geni del sistema di QS 20 naturale sono stati espressi in *E. coli* ed i suoi componenti sono stati utilizzati per dimostrare la comunicazione cellula-cellula in questo ospite (Engebrecht, Cell 1983, 32: 773-781; Devine *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 86:5688-92).

[37] Alcuni batteri con proteine omologhe a LuxR e LuxI 25 producono anche auto-induttori HSL simili o identici a HSL di *V.*

fischeri (vedere Tabella 1) e che formano complessi di proteina tipo LuxR/auto-induttore che possono essere utilizzati nella pratica dell'invenzione.

Tabella 1.

| Organismo | Sintetasi di HSL | Recettore di HSL | Molecola di segnale | N. di accesso GenBank |
|--|---|--|--|--------------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophilia</i> | AhyI (per esempio, SEQ ID NO:1) | AhyR (per esempio, SEQ ID NO:2) | N-(butiril)-L-omoserina lattone (BHL), N-(esanoil)-L-omoserina lattone (HHL) | X89469 |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | AsaI (per esempio, SEQ ID NO:3) | AsaR (per esempio, SEQ ID NO:4) | BHL, HHL | U65741 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | TraI (per esempio, SEQ ID NOS:5, 6) | TraR (per esempio, SEQ ID NO:7), TraM (per esempio, SEQ ID NO:8) | N-(ossoottanoil)-L-omoserina lattone (OOHL) | L17024, L22207, AF065246, ABB59514.1 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | CviI (per esempio, SEQ ID NO:9) | CviR (per esempio, SEQ ID NO:10) | HHL | AY277257 |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | EagI (per esempio, SEQ ID NO:11) | EagR | N-e-(ossoesanoil)-omoserina lattone (OHHL) | X74300 |
| <i>Erwinia cartovora</i> subsp. <i>cartotovora</i> | CarI (Expl) (per esempio, SEQ ID NO:13) | CarR (per esempio, SEQ ID NO:12) | OHHL | U17224, X74299 |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | Expl (per esempio, SEQ ID NO:14) | pR (per esempio, SEQ ID NO:15) | Ex | X96440 |
| | EchI (per esempio, SEQ ID NO:16) | hR (per esempio, SEQ ID NO:17) | Ec | U45854 |
| <i>Erwinia</i> | EsaI (per | EsaR (per | OHHL | L32183, |

| | | | | |
|--|---|--|--|--|
| <i>sterwartii</i> | esempio, SEQ ID NO:18) | esempio, SEQ ID NO:19) | | L32184 |
| <i>Escherichia coli</i> | | SdiA (per esempio, SEQ ID NO:20) | | YP_001458706 |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | | | OHHL | |
| <i>Obesumbacterium proteus</i> | OprI | OprR | OHHL | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | RhlII (per esempio, SEQ ID NO:22); VsmI (per esempio, SEQ ID NO:23) | RhlR (per esempio, SEQ ID NO:21); VsmR (per esempio, SEQ ID NO:24) | N- (ossododecanioil)-L-omoserina lattone (OdDHL) | M59425, SwissProt P33993, L08962, U11811, U15644 |
| <i>Pseudomonas aeureofaciens</i> | PhzI (per esempio, SEQ ID NO:26) | PhzR (per esempio, SEQ ID NO:25) | | L32729, L33724 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | PhzI (per esempio, SEQ ID NO:27) | PhzR (per esempio, SEQ ID NO:28) | HHL | L48616 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i> | PsyI (per esempio, SEQ ID NO:29) | PsyR (per esempio, SEQ ID NO:30) | | AF110468 |
| <i>Ralstonia solancearum</i> | SolI (per esempio, SEQ ID NO:31) | SolR (per esempio, SEQ ID NO:32) | | AF021840 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | | RhiR (per esempio, SEQ ID NO:33) | N-(3R-idrossi-7-cis-tetradecanoil)-L-omoserina lattone, batteriocina piccola | M98835 |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | CerI (per esempio, SEQ ID NO:34) | CerR (per esempio, SEQ ID NO:35) | | AF016298 |

| | | | | |
|------------------------------------|--|---|---|--|
| <i>Serratia liquifaciens</i> | SwrI (per esempio, SEQ ID NO:37) | | BHL | U22823 |
| <i>Vibrio anguillarum</i> | VanI (per esempio, SEQ ID NO:37) | VanR (per esempio, SEQ ID NO:38) | N-(ossodecanoil)-L-omoserina lattone (ODHL) | U69677 |
| <i>Vibrio fischeri</i> | LuxI (per esempio, SEQ ID NOS:39, 40) AinI per esempio, SEQ ID NO:41) | LuxR (per esempio, SEQ ID NOS:42, 43) nR (per esempio, SEQ ID NO:44) | OHHL, HHL N-(ottanoil)-L-omoserina lattone (OHL) | M19039, M96844, M25752 L37404 |
| <i>Vibrio harveyi</i> | LuxL (per esempio, SEQ ID NO:45) LuxM (per esempio, SEQ ID NO:46) | LuxN (per esempio, SEQ ID NO:47) | N-(idrossibutiril)-L-omoserina lattone (HBHL) | L13940 |
| <i>Xenorhabdus nematophilus</i> | | | HBHL o un omologo stretto | |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | YenI (per esempio, SEQ ID NO:49) | YenR (per esempio, SEQ ID NO:48) | OHHL, HHL | X76082 |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | YepI | YepR | OHLL, HHL | |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | YukI | YukR | | |

[38] Le molecole di segnale elencate nella Tabella 1 hanno frazioni funzionali di omoserina lattone identiche ma possono differire in lunghezza e struttura di loro gruppi acile. LuxI ed enzimi corrispondenti da altre specie catalizzano la ligazione di S-adenosilmetionina (SAM) ed una catena di acile grasso derivata da coniugati di acile-proteina di trasportatore di acile (ACP). 5

[39] "Proteine tipo LuxR" secondo l'invenzione sono tipicamente composte da due moduli, un dominio ammino-terminale

(residui 1 a 160 di LuxR, numerati secondo SEQ ID NO:42) con una regione di legame di HSL (residui 79-127 di LuxR, numerati secondo SEQ ID NO:42) ed un dominio carbossi-terminale di regolazione della trascrizione (residui 160-250 di LuxR, numerati secondo SEQ ID NO:42), che comprende un motivo di legame di DNA ad elica-giro-elica (residui 200-224 di LuxR, numerati secondo SEQ ID NO:42). L'un terzo di carbossi-terminale di queste proteine è omologo a domini di legame di DNA della superfamiglia di regolatori trascrizionali di LuxR.

10 [40] "Proteine tipo LuxI" secondo l'invenzione sono proteine che producono un auto-induttore (come quelle elencate in Tabella 1) che si lega ad una proteina tipo LuxR per formare un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore. Un "complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore" attiva l'espressione genica ad una determinata densità cellulare che corrisponde ad una concentrazione di 15 soglia di auto-induttore. È stato proposto un meccanismo generale di attivazione per questa superfamiglia di proteine; vedere Brevetto U.S. 7 202 085.

20 [41] LuxR si lega come un omomultimero al sito di legame di LuxR, che ha una simmetria bivalente, ed una regione richiesta per multimerizzazione risiede all'interno di amminoacidi 116 e 161 della porzione ammino-terminale della proteina, numerati secondo SEQ ID NO:42.

25 [42] Il sito di legame di LuxR, o box di lux (5'-ACCTGTAGGATCGTACAGGT-3' SEQ ID NO:50), è una ripetizione di 20 nucleotidi invertita centrata 44 nucleotidi a monte del sito di inizio della

trascrizione dell'operone di luminescenza (Devine *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5688 5692, 1989; Gray *et al.*, J. Bacteriol. 176:3076 3080, 1994). Analogamente, box di tra di 18-bp vengono trovati a monte di almeno tre promotori regolati da TraR e sono richiesti per l'attivazione 5 trascrizionale da parte di TraR (Fuqua and Winans, J. Bacteriol. 178:435 440, 1996). Sequenze simili trovate in promotori regolati da LasR si sovrappongono invariabilmente ad elementi putativi a -35 di promotori tipo σ^{70} per un nucleotide. I box di lax e las sono sufficientemente simili così che LuxR può attivare la trascrizione dal 10 promotore di lasB in presenza di HSL, e, per converso, LasR può attivare la trascrizione dell'operone di luminescenza in presenza di PAI--I (Gray *et al.*, J. Bacteriol. 176:3076 3080, 1994). Un numero di sequenze simili a box di lux (anche riferite qui come "elementi di 15 risposta di HSL") sono state confrontate (Tabella 2). La sequenza consenso tipo box di lux è 5'-RNSTGYA-GATN-TRCASRT-3' (SEQ ID NO:51). Elementi di risposta di HSL sintetici possono essere prodotti variando uno o più nucleotidi di una sequenza nativa tipo box di lux. Per esempio come discusso in Brevetto U.S. 7 202 085, quando TraR viene espresso in cellule di carota, un promotore che comprende il box 20 di traA mostra un livello di attività basale più elevata di quanto atteso. Questa attività basale può essere significativamente ridotta senza eliminare la sensibilità a HSL sostituendo il box di traA con un box variante in cui un piccolo numero di coppie di basi del box di traA sono alterate.

[43] Promotori sintetici che rispondono a HSL possono essere prodotti sostituendo elementi di risposta ad HSL da un promotore con un elemento di risposta a HSL da un altro promotore, o aggiungendo un elemento di risposta a HSL nativo o sintetico ad un 5 promotore che manca di un elemento di risposta a HSL funzionale, come un promotore minimo. In aggiunta, due o più elementi di risposta a HSL possono essere presenti in un singolo promotore per rendere il promotore rispondente a più di un HSL. Un promotore che comprende uno o più elementi di risposta a HSL viene riferito qui come un 10 "promotore che risponde a HSL".

Tabella 2.

| gene | Sequenza tipo box di lux | SEQ ID NO: |
|---------------|--------------------------|------------|
| <i>luxI</i> | ACCTGTAGGATCGTACAGGT | 52 |
| <i>luxD</i> | GAATGGATCATTTCAGGT | 53 |
| <i>lasB</i> | ACCTGCCAGTTCTGGCAGGT | 54 |
| <i>esaR</i> | ACCTGCACATAGTACAGGC | 55 |
| <i>cepl</i> | CCCTGTAAGAGTTACCAAGTT | 56 |
| <i>solI</i> | CCCTGTCAATCCTGACAGTT | 57 |
| <i>rhII</i> | CCCTACCAGATCTGGCAGGT | 58 |
| <i>traI1</i> | ACGTGCA-GATC-TGCACAT | 59 |
| <i>traI2</i> | AAGTGCA-GATT-TGCACAT | 60 |
| <i>traA</i> | ATGTGCA-GATC-TGCACAT | 61 |
| <i>traA1</i> | gTGTGCA-GATC-TGCACAc | 62 |
| <i>traA2</i> | AgGTGCA-GATC-TGCACcT | 63 |
| <i>traA3</i> | ATtTGCA-GATC-TGCAaAT | 64 |
| <i>traA4</i> | ATGaGCA-GATC-TGCtCAT | 65 |
| <i>traA5</i> | ATGTccCA-GATC-TGgACAT | 66 |
| <i>traA6</i> | ATGTGaA-GATC-TtCACAT | 67 |
| <i>traA7</i> | ATGTGCG-GATC-cGCACAT | 68 |
| <i>traA8</i> | ATGTGCA-aATt-TGCACAT | 69 |
| <i>traA9</i> | ATGTGCA-GtaC-TGCACAT | 70 |
| <i>traA-1</i> | ATGTGCA-GA-C-TGCACAT | 71 |

[44] Altri promotori regolati da TraR e LasR mancano di questi siti. Per esempio, il gene di *lasI* non ha un box di las riconoscibile a monte del suo promotore (Passador et al., Science 260:1127 1130, 1993) ed è tuttavia fortemente inducibile da LasR. Analogamente, il 5 gene di *traM* di *A. tumefaciens* appare avere due metà-siti a monte del suo promotore piuttosto che un box di tra convenzionale (Fuqua et al., J. Bacteriol. 177:1367 1373, 1995; Hwang et al., J. Bacteriol. 177:449 458, 1995) ed è debolmente inducibile da TraR. La proteina di TraR attiva anche l'espressione del gene di *traR* ad un promotore che non ha 10 similarità apparente a qualsiasi motivo di box di tra. Nel caso di promotori di TraR che hanno una similarità forte ai motivi di box di tra di consenso, vengono attivati per l'espressione a livello elevato da 3-oxooctanoil-omoserina lattone (AAI), e motivi più degenerati sono associati con livelli di induzione più bassi.

[45] I promotori di quorum-sensing possono essere alterati per renderli rispondenti ad un auto-induttore HSL diverso mediante "scambio di operatore", vale a dire, sostituendo sequenza(e) tipo box di lux dal promotore con una sequenza tipo box di lux da un promotore differente. Per esempio, una sequenza di box di lux in un 20 promotore può essere sostituita da una sequenza di box di tra o las. La sensibilità ad HSL può anche essere modificata mediante "scambio di dominio", vale a dire sostituendo una regione di legame a HSL di una proteina tipo LuxR con la regione di legame a HSL di un'altra proteina tipo LuxR in modo tale che la specificità di legame a DNA della proteina 25 chimerica risultante sia inalterata. Per esempio, la sostituzione della

regione di legame a HSL di LuxR con la regione di legame a HSL di TraR indurrebbe la proteina chimerica risultante a legare la sequenza di box di lux e modulare l'attività trascrizionale in risposta al legame dell'auto-induttore HSL. In aggiunta, il dominio di attivazione di una proteina tipo LuxR può essere sostituito da un altro dominio di attivazione che è un attivatore di espressione genica ben conosciuto in una determinata cellula ospite, come GAL4, VP16, o altri domini di attivatore ben conosciuti.

[46] Nuovi membri della famiglia di LuxR-LuxI sono stati ricercati vagliando batteri per il rilascio di auto-induttori utilizzando un ceppo di *Escherichia coli* contenente un regulone di lux clonato ma mancante di luxI (e di conseguenza non sintetizzante HSL). Esperimenti simili sono stati eseguiti con regolatore di TraR di *Agrobacterium tumefaciens* per vagliare batteri del suolo patogenetici per piante. Questi studi hanno dimostrato che LuxR e TraR vengono attivati da un sottoinsieme di auto-induttori conosciuti. È stato anche dimostrato che proteine tipo LuxR come LuxR e LasR di *Pseudomonas aeruginosa* attivano l'espressione genica di lux dopo aver legato derivati degli auto-induttori affini con alterazioni in lunghezza di catena di acile o nei gruppi di carbonile, per esempio (Eberhard et al., Arch. Microbiol. 146:35-40, 1986; Kuo et al., J. Bacteriol. 176:7558-7565, 1994; Kuo et al., J. Bacteriol. 178:971-976, 1996; Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:197-201, 1994; Fuqua and Winans, J. Bacteriol. 176:2796-2806, 1994).

[47] EsaR, ExpR, e YenR sono riportati essere repressori dei loro geni bersaglio piuttosto che attivatori, ed i loro rispettivi auto-induttori incrementano l'espressione dei geni repressi, cosa che può essere utile per dereprimere un gene a densità cellulare elevata.

5 Proteine di LuxR mutate e molecole di acido nucleico che codificano per proteine di LuxR mutanti

[48] L'invenzione fornisce proteine di LuxR mutate e molecole di acido nucleico isolate che codificano per le proteine di LuxR mutate. Proteine di LuxR mutate secondo l'invenzione possono esibire 10 attività regolatoria migliorata rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico e possono di conseguenza essere utilizzate per ottimizzare il controllo di espressione di un gene di interesse. Una proteina di LuxR mutata ha "attività regolatoria migliorata" se essa ha uno o più dei seguenti effetti: (1) un livello di induzione basale più basso paragonato 15 con quello di un LuxR di tipo selvatico; (2) un livello di induzione più forte paragonato con quello di un LuxR di tipo selvatico; e (3) induzione ritardata paragonata con quella di un LuxR di tipo selvatico. Esempi di proteine di LuxR mutanti con attività regolatoria migliorata vengono descritti in Esempio 7 ed in **FIG. 10**. L'utilizzo di molecole di acido 20 nucleico comprendenti sequenze mutate ha come risultato un livello di espressione basale alterato di un gene di interesse e/o esse incrementano la forza di auto-induzione (*vale a dire*, un livello di espressione più rapido o più elevato dopo che viene innescata l'auto-induzione).

[49] In alcune forme di realizzazione le proteine di LuxR mutate hanno un C-terminale allungato. In alcune forme di realizzazione il C-terminale è allungato di tra 1 e 20 amminoacidi (*per esempio*, tra 5 e 20 amminoacidi; tra 5 e 10 amminoacidi; tra 5 e 15 5 amminoacidi; o di una aggiunta di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 amminoacidi). In alcune forme di realizzazione il C-terminale del LuxR mutante è allungato di 6 o di 15 amminoacidi; esempi di tali proteine di LuxR mutanti vengono mostrati in SEQ ID NO:72 e SEQ ID NO:75.

10 **LuxR 1M37-2M27-2M28 (SEQ ID NO:72)**

MKDINADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMHCEYYLLAI
IYPHSMVKSDISILDNYPKKWRQYYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIFE
NNAVNKKSPNVIKEAKSSGLITGFSFPIHTANNGFGMLSFAHSEKDNYIDSL
FLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSNNDLTKREKECLAWACEGKSSW
15 DISKILGCSKRTVTFHLTNAQMKLNTTNRCQSISKAILTGAIDCPYFKV**KYVS**
KA

LuxR 2M15 (SEQ ID NO:75)

MKDINADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMHCEYYLLAI
IYPHSMVKSDISILDNYPKKWRQYYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIFE
20 NNAVNKKSPNVIKEAKSSGLITGFSFPIHTANNGFGMLSFAHSEKDNYIDSL
FLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSNNDLTKREKECLAWACEGKSSW
DISKILGCSKRTVTFHLTNAQMKLNTTNRCQSISKAILTGAIDCPYFKV**KYVS**
KAKGNSTTLD

[50] In alcuni casi una proteina di LuxR mutante ha un 25 troncamento C-terminale di 1-10 amminoacidi contigui al C-terminale

ed una attività regolatoria migliorata (*per esempio*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10). Gli amminoacidi rimossi per delezione preferibilmente sono contigui. In altri casi, vengono rimossi da LuxR solamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 amminoacidi al C-terminale; un esempio di questo tipo di 5 proteina di LuxR mutante viene mostrato in SEQ ID NO:74.

LuxR 1M27 (SEQ ID NO:74)

MKDINADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMHCEYYLLAI
IYPHSMVKSDISILDNYPKKWRQYYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIFE
NNAVNKKSPNVIKEAKSSGLITGFSFPIHTANNGFGMLSFAHSEKDNYIDSL
10 FLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSNNDLTKREKECLAWACEGKSSW
DISKILGCSKRTVTFHLTNAQMKLNTTNRCQSISKAILTGAIDCPYF—

[51] In altri casi amminoacidi alterati sono presenti nella regione autoregolatoria di LuxR mutante tra posizioni amminoacidiche 8 e 20, numerate secondo la sequenza amminoacidica di tipo selvatico 15 di LuxR mostrata in SEQ ID NO:42. In alcune forme di realizzazione la posizione amminoacidica 8 ha un amminoacido alterato; un esempio di questo tipo di proteina di LuxR mutante viene mostrato in SEQ ID NO:73.

LuxR 1M16 (SEQ ID NO:73)

20 MKDINADNTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMHCEYYLLAI
YPHSMVKSDISILDNYPKKWRQYYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIFE
NNAVNKKSPNVIKEAKSSGLITGFSFPIHTANNGFGMLSFAHSEKDNYIDSL
FLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSNNDLTKREKECLAWACEGKSSW
DISKILGCSKRTVTFHLTNAQMKLNTTNRCQSISKAILTGAIDCPYFKS

[52] L'invenzione fornisce una molecola di acido nucleico isolata comprendente sequenze codificanti per le proteine di LuxR mutanti descritte sopra. Esempi di tali sequenze codificanti vengono mostrati in SEQ ID NOS:144-149 (complementari inversi di SEQ ID 5 NOS:138-143). Come spiegato negli Esempi specifici, sotto, sequenze codificanti mutanti possono essere ottenute utilizzando mutagenesi casuale per PCR propensa ad errore come descritto in Cadwell & Joyce, PCR Methods Appl. 1992 Aug;2(1):28-33. Vedere Esempio 7 e Tabella 10 12.

Geni ottimizzati per codone

[53] In alcune forme di realizzazione le molecole di acido nucleico comprendono sequenze codificanti alterate che non influiscono sulla sequenza amminoacidica di LuxR ma che hanno un effetto su 15 cinematiche di espressione. Molti problemi nell'esprimere un gene eterologo in un ceppo ospite estraneo sono il risultato della differenza tra l'uso di 20 codone tra il ceppo ospite (*per esempio, E. coli*) ed il ceppo da cui la proteina eterologa è nativa. Codoni rari possono essere specialmente un problema. Gli amminoacidi vengono codificati da più di un codone, e ciascun organismo ha una preferenza nell'utilizzo di codoni, conosciuta 25 anche come bias di uso di codone. La popolazione di tRNA rivela il bias di codone in una determinata cellula (Dong (1996) J Mol Biol 260:649-663). La sovraespressione di una proteina eterologa, in cui alcuni tRNA possono essere rari o mancanti nell'ospite di espressione può impedire la sua espressione. Questo può infine causare per esempio uno stallo 25 traduzionale, una terminazione della traduzione prematura, uno

spostamento di cornice della traduzione, ed una incorporazione errata di amminoacido (Kurland and Gallant (1996) Curr Opin Biotechnol 7:489-493).

[54] Analisi della sequenza nucleotidica di *luxR* mostra che la traduzione di mRNA di *luxR* e *luxI* richiede l'utilizzo di tRNA raro in *E. coli*. L'invenzione di conseguenza fornisce molecole di acido nucleico comprendenti sequenze di polinucleotide di *luxR* o *luxI* da *V. fischeri* in cui uno o più codoni della sequenza codificante sono ottimizzati per l'espressione di LuxI e/o LuxR in una cellula ospite, preferibilmente *E. coli*. Preferibilmente la sequenza intera di polinucleotide viene ottimizzata per codone (*vale a dire*, tanti codoni quanto possibile sono alterati per un'espressione ottimizzata). Benefici associati con sequenza ottimizzata comprendono il fatto che l'espressione completa di elementi regolativi non limita la regolazione e l'espressione di gene bersaglio dal promotore di *luxI*. La modificazione di siti di restrizione fornisce l'opzione di avere siti di restrizione unici in plasmidi. Vettori di espressione che contengono sequenze ottimizzate per codone sono molto efficienti per la produzione su larga scala con efficienza migliorata per l'espressione di un gene di interesse.

[55] Una sequenza codificante per LuxR di tipo selvatico viene mostrata in SEQ ID NO:77. Esempi di sequenze codificanti per LuxR ottimizzate per codone vengono fornite come SEQ ID NOS:78-88 e 133. Una sequenza codificante per LuxI di tipo selvatico viene mostrata in SEQ ID NO:76. Esempi di sequenze codificanti per LuxI ottimizzate per codone vengono fornite come SEQ ID NOS:89-97 e 134.

[56] L'invenzione fornisce anche un metodo per ottimizzare l'espressione di LuxR o LuxI in una cellula ospite (per esempio, *E. coli*). Il metodo comprende (i) ottenere una sequenza di polinucleotide di *luxR* o *luxI*; e (ii) modificare la sequenza di 5 polinucleotide per ottimizzare l'uso di codone nella cellula ospite. L'ottimizzazione può essere in particolare ottenuta mediante modificazioni della sequenza dei geni di *luxR* e/o *luxI* per intensificare la compatibilità con l'uso di codone di una particolare cellula ospite. Metodi di ottimizzazione di codone possono anche essere utilizzati per 10 ottenere sequenze ottimizzate per codone che codificano per proteine tipo LuxI e tipo LuxR (*per esempio*, come elencato in Tabella 1).

Vettori di espressione

[57] Elementi del macchinario di QS come quelli descritti sopra possono essere utilizzati per costruire vettori di espressione (per esempio, plasmidi) per la trasformazione di una cellula ospite. Questi 15 vettori di espressione possono essere utilizzati in metodi dell'invenzione, in particolare metodi che si basano sulla interferenza trascrizionale. “Interferenza trascrizionale” è la perturbazione di un'unità di trascrizione da parte di un'altra. L'interferenza trascrizionale può avere 20 un'influenza, generalmente soppressiva, di un'unità trascrizionale attiva su un'altra unità trascrizionale collegata in cis. Gli studi di Eszterhas *et al.* (2002, Mol. Cell. Biol. 22, 469–479) hanno suggerito che due unità trascrizionali strettamente collegate interferiranno sempre l'una con l'altra. È stato mostrato che due promotori che sono posti di fronte 25 (chiamati anche promotori convergenti) hanno mostrato l'interferenza

più significativa rispetto a promotori che sono in tandem (nella medesima direzione) o divergenti (direzione opposta). L'interferenza trascrizionale è stata studiata in *E. coli* ed in cellule eucariotiche (Padidam e Cao, 2001; Eszterhas *et al.*, 2002; Prescott e Proudfoot, 5 2002). Vedere Shearwin *et al.*, *TRENDS in Genetics* 21, 339-45. 2005.

[58] Nella descrizione che segue, LuxI e LuxR vengono utilizzati come esempi; tuttavia, l'invenzione include esplicitamente forme di realizzazione simili in cui viene utilizzato altro macchinario di QS (per esempio, proteine tipo LuxR e tipo LuxI come definito sopra, 10 comprese quelle elencate nella Tabella 1).

[59] È noto che LuxR è necessario per la regolazione di espressione di gene sotto il promotore di P_{luxI} (Shadel *et al.*, 1992). In una forma di realizzazione dell'invenzione, il promotore utilizzato per l'interferenza di trascrizione è un promotore inducibile come P_{lac} , P_{bad} , 15 P_{tac} , P_{tcr} , P_{trp} , e P_{met} . Altri promotori inducibili comprendono promotori di ADH2, GAL-1-10, GAL 7, PHO5, T7, T5, e metallotioneina. Altri esempi di promotori inducibili sono elencati in Tabella 3. Questi elenchi non sono esaustivi. Il promotore che interferisce può essere orientato in maniera convergente, in tandem, o in maniera divergente rispetto al 20 promotore che deve essere represso. Quando il promotore che deve essere represso è il promotore di gene di *luxR*; il promotore che interferisce preferibilmente è orientato in maniera convergente. Esso è adeguatamente posizionato a monte del gene di *luxR*, preferibilmente a monte. Quando il promotore che deve essere represso è il promotore di 25 LuxR/auto-induttore, il promotore che interferisce è preferibilmente

orientato in maniera convergente. Esso è adeguatamente posizionato a monte del gene di interesse, preferibilmente a monte.

Tabella 3.

| Promotore | Regolatore | Induzione |
|--|--------------------------------|--|
| Inducibile | | |
| <i>lac</i> | LacI, LacI _{ts} | isopropil- β -D-tiogalattoside (IPTG), temperatura |
| <i>trc e tac</i> | LacI, LacI _{ts} | IPTG, temperatura |
| λP_l | λ cI _{ts} 857 | temperatura |
| <i>T7</i> | LacI, LacI _{ts} | IPTG, temperatura |
| <i>P_{BAD}</i> | AraC | L-arabinosio |
| <i>cspA</i> (Mujacic <i>et al.</i> (1999) Gene. 238(2): 325-332) | | temperatura |
| <i>rhaPBAD</i> | RhaR, RhaS | L-ramnosio |
| <i>tetA</i> | TetR | Tetraciclina |
| <i>Pm</i> | XylS | acido m-toluico |
| <i>lpp</i> (Nakamura, K., and M. Inouye. | | IPTG, lattosio |

| | | |
|--|-------------|------------------------|
| 1982 EMBO J. 1:771-775) | | |
| <i>recA</i> | LexA | Acido Nalidixico |
| <i>Psyn</i> (Giacobini <i>et al.</i> 1994. Gene 144:17-24) | LacI, LacIq | IPTG |
| <i>pL-9G-50</i> (Oppenheim <i>et al.</i> , WO 96/03521) | | Temperatura (<20°C) |
| <i>Operatore</i> <i>lac di T3</i> | LacIq, | IPTG |
| <i>Operatore</i> <i>lac di T5</i> | LacIq, LacI | IPTG |
| <i>T4 gene 32</i> (Gorski <i>et</i> <i>al.</i> 1985 Cell 43:461- 469) | | Infezione di T4 |
| <i>operatore di</i> <i>nprM-lac</i> | LacIq | IPTG |

| | | |
|--|------------|----------------------------------|
| (Yamada et al. 1991 Gene 99:109–114) | | |
| <i>Proteina A</i> | | |
| Regolato da nutrienti | | |
| <i>phoA</i> | PhoB, PhoR | Deplezione di fosfato |
| <i>ugpBAECQ</i> (Su et al., 1991 Mol. Gen. Genet. 230, 28–32) | | Deplezione di glucosio e fosfato |
| <i>proU</i> (Herbst et al., 1994 Gene 151: 137–142) | | Osmolarità (NaCl) |
| <i>vglnAp2</i> (Schroeckh et al. 1992, DE | | Deplezione di azoto |

| | | |
|--|------|---|
| 4102594) | | |
| <i>trp</i> | | Deplezione di triptofano, IAA |
| <i>cst-1</i> | | Deplezione di glucosio |
| <i>mglBAEC</i> (Death and Ferenci 1994. J. Bacteriol. 176, 5101- 5107) | MglD | Aggiunta di glucosio |
| <i>araB</i> | | Deplezione di glucosio ed aggiunta di arabinosio |
| <i>Promotori di privazione</i> (Matin. 1994, Ann. N. Y. Acad. Sci. 721:277- 291) | | |
| Regolato | | |

| | | |
|--|-----------------|------------------------------|
| da ossigeno | | |
| <i>vhb</i> (Dikshit <i>et al.</i> 1990. Acids Res. 18, 4149– 4155) | | Microanaerobico, cAMP-CAP |
| <i>pfl</i> (Oxer <i>et al.</i> 1991 Nucleic Acids Res. 19, 2889– 2892) | | Anaerobico |
| <i>nirB</i> | Fnr (FNR, NARL) | Anaerobico |
| <i>nar</i> | | Anaerobico |
| Regolato da pH | | |
| <i>cadA</i> | CadR | pH Acido |

[60] Per esempio, l'inibizione del sistema di auto-induzione a densità cellulare elevata può essere ottenuta inibendo l'espressione di *luxR*. Per questo fine, un promotore inducibile tipo il 5 promotore di T7 può essere inserito a monte del gene di *luxR* ed in un orientamento convergente rispetto al promotore del gene di *luxR* nel

vettore di espressione auto-inducibile. Questo vettore può essere introdotto per esempio nel ceppo di *E. coli* BL21DE3 dove il promotore di T7 è inducibile mediante l'aggiunta di IPTG nel terreno, e può essere osservata la repressione di *luxR* mediante interferenza trascrizionale.

5 [61] Un'ampia varietà di vettori di espressione sono commercialmente disponibili e possono essere utilizzati per produrre vettori di espressione dell'invenzione. In alternativa, i vettori di espressione possono essere costruiti utilizzando metodi del DNA ricombinante noti da molto tempo nell'arte. Questi vettori comprendono, 10 ma non sono limitati a plasmidi, cosmidi, Bac, Pac, batteriofago, elementi trasponibili e sistema di espressione transiente. Il vettore può essere un plasmide a numero di copie basso, medio o elevato. Vettori di espressione preferiti comprendono, ma non sono limitati a, pSM214G, pKMSal, pLAIET32, pLAIR32, pLAIET42, pLAIR42, pGlowlux506, 15 pGLEM, pGlow, pKMluxI-, e pET21.

[62] In alcune forme di realizzazione, un vettore di espressione comprende (1) un primo gene operativamente collegato ad un primo promotore inducibile che è inducibile da un complesso di LuxR/auto-induttore; e (2) un secondo gene operativamente collegato 20 ad un secondo promotore inducibile, in cui il secondo promotore inducibile non viene indotto dal complesso di LuxR/auto-induttore. In tali vettori di espressione, l'espressione del secondo gene interferisce con l'espressione del primo gene per mezzo di interferenza trascrizionale. In alcune forme di realizzazione il primo gene codifica per 25 il LuxR. In altre forme di realizzazione il primo gene codifica per una

proteina di interesse. Quando *luxR* è presente in un vettore di espressione, il secondo promotore inducibile può essere orientato in modo tale che l'attivazione del promotore interferisca con l'espressione di *luxR*.

5 [63] In ancora un'altra forma di realizzazione il vettore comprende inoltre *luxI*. Preferibilmente *luxI* è operativamente collegato ad un terzo promotore che risponde all'induzione da parte del complesso di LuxR/auto-induttore. In alcune forme di realizzazione un vettore di espressione codifica per entrambi LuxR e la proteina di 10 interesse. In altre forme di realizzazione, geni di *luxI* e *luxR* di *V. fischiae* sono presenti su vettori di espressione singoli o separati, mentre il gene di interesse, operativamente collegato al promotore di *luxI*, è presente in un vettore di espressione.

Proteine di interesse

15 [64] Qualsiasi proteina di interesse può essere espressa utilizzando metodi dell'invenzione. La proteina di interesse può essere qualsiasi polipeptide eucariotico e procariotico, come per esempio proteine da mammiferi, piante, lievito, funghi, batteri, archeobatteri, protozoi, alghe, virus, e fago. La proteina di interesse può essere un 20 prione. La proteina di interesse può essere naturale o sintetica come per esempio la proteina sintetica N19 (US 6 855 321, Baraldo et al., 2004 Infect Immun. 72:4884-7). Esempi di proteine che possono essere prodotti in maniera ricombinante utilizzando l'invenzione comprendono proteine secretorie, proteine periplasmatiche, proteine transmembrana,

proteine citoplasmatiche e proteine che si localizzano in organelli specifici all'interno della cellula ospite.

[65] Tipicamente la proteina di interesse è un antigene, che può essere utilizzato in vaccini, per stimolare risposte immunitarie.

5 Antigeni comprendono antigeni da un batterio Gram positivo (*per esempio, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus equi, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Listeria*). Antigeni preferiti vengono divulgati, per esempio, in
10 WO02/34771, WO03/093306, WO04/018646, WO04/041157, WO05/028618, WO05/032582, WO06/042027, WO06/069200, WO06/078318, WO02/094868, Nencioni L, 1991, *Adv Exp Med Biol.* 303:119-27, WO1985/003508, e WO2007/026247 e includono quelli elencati sotto, così come loro combinazioni e/o frammenti.

15 **[66]** Altre proteine di interesse sono antigeni di batteri Gram negativi come *Neisseria meningitidis* sierogruppo A, B, C, W135 e Y, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* non tipizzabile, *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, ceppi patogenetici extra-intestinali di *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*,
20 *Helicobacter pylori*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*. Sequenze codificanti per questi ed altri antigeni di interesse vengono divulgati, per esempio, in WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO00/22430, Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820 e WO96/29412, WO99/24578, 25 WO99/36544, WO99/57280, WO1992/019265, WO2005/111066,

WO2007/049155, WO/1989/001976, WO/1990/04641, WO2006/089264, WO2006/091517, e WO2008020330. Altri antigeni di interesse sono antigeni di *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Plasmodium falciparum*, *Candida albicans*, virus 5 dell'epatite A, virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, Virus SARS-Corona, ed HIV. Sequenze codificanti per questi ed altri antigeni di interesse vengono divulgate, per esempio, in WO95/28487, WO00/37494, WO03/068811, WO03/049762, WO2005/002619, WO2006/138004, WO2007/110700, WO02/02606, WO2005/084306, 10 WO1992/019758, WO1996/004301, WO2007/041432, e WO1995/033053.

[67] *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus di gruppo B): Antigeni di *Streptococcus* di gruppo B includono una proteina o un antigene di saccaride identificati in WO 02/34771, WO 03/093306, WO 15 04/041157, o WO 2005/002619 (comprese proteine GBS 67 (SAG1408), GBS 80 (SAG0645), GBS 104 (SAG0649), e GBS 322 (SAG0032), e compresi antigeni di saccaride derivati da sierotipi Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII e VIII).

[68] *Streptococcus pneumoniae*: Antigeni di *Streptococcus pneumoniae* possono comprendere un saccaride (compreso un polisaccaride o un oligosaccaride) e/o proteina da *Streptococcus pneumoniae*. Antigeni di saccaride possono essere selezionati da sierotipi 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, e 33F. Antigeni di proteine possono essere 25 selezionati da una proteina identificata in WO 98/18931, WO

98/18930, Brevetto US No. 6 699 703, Brevetto US No. 6 800 744, WO 97/43303, e WO 97/37026. Proteine di *Streptococcus pneumoniae* possono essere selezionate dalla famiglia di Triade di Poli Istidina (PhtX), la famiglia di proteina di legame di colina (CbpX), troncati di 5 CbpX, famiglia di LytX, troncati di LytX, proteine chimeriche di troncati di CbpX-troncati di LytX, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133.

[69] *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus di gruppo A): Antigeni di *Streptococcus* di gruppo A possono comprendere una 10 proteina identificata in WO 02/34771 o WO 2005/032582 (compresi, ma non limitati a, GAS39 (spy0266; gi-15674446), GAS40 (spy0269; gi- 15674449), GAS42 (spy0287; gi-15674461), GAS45 (M5005_spy0249; gi- 71910063), GAS57 (spy0416; gi-15674549), GAS58 (spy0430; gi- 15674556), GAS84 (spy1274; gi-15675229), GAS95 (spt1733; gi- 15675582), GAS117 (spy0448; gi-15674571), GAS130 (spy0591; gi- 15674677), GAS137 (spy0652; gi-15674720), GAS159 (spy1105; gi- 15675088), GAS193 (spy2025; gi-15675802), GAS202 (spy1309; gi- 15675258), GAS217 (spy0925; gi-15674945), GAS236 (spy1126; gi- 15675106), GAS253 (spy1524; gi-15675423), GAS277 (spy1939; gi- 15675742), GAS294 (spy1173; gi-15675145), GAS309 (spy0124; gi- 15674341), GAS366 (spy1525; gi-15675424), GAS372 (spy1625; gi- 15675501), GAS384 (spy1874; gi-15675693), GAS389 (spy1981; gi- 15675772), GAS504 (spy1751; gi-15675600), GAS509 (spy1618; gi- 15675496), GAS290 (spy1959; gi-15675757), GAS511 (spy1743; gi- 25 15675592), GAS527 (spy1204; gi-15675169), GAS529 (spy1280; gi-

15675233), e GAS533 (spy1877; gi-15675696)), fusioni di frammenti di proteine M di GAS (comprese quelle descritte in WO 02/094851, e Dale, Vaccine (1999) 17:193-200, e Dale, Vaccine 14(10): 944-948), proteina di legame di fibronectina (Sfb1), proteina associata ad eme 5 Streptococcale (Shp), e Streptolisina S (SagA). Ulteriori antigeni di GAS comprendono GAS68 (Spy0163; gi13621456), GAS84 (Spy1274; gi13622398), GAS88 (Spy1361; gi13622470), GAS89 (Spy1390; gi13622493), GAS98 (Spy1882; gi13622916), GAS99 (Spy1979; gi13622993), GAS102 (Spy2016, gi13623025), GAS146 (Spy0763; 10 gi13621942), GAS195 (Spy2043; gi13623043), GAS561 (Spy1134; gi13622269), GAS179 (Spy1718, gi13622773) e GAS681 (spy1152; gi1362228).

[70] *Staphylococcus aureus*: Antigeni di *Staphylococcus aureus* comprendono polisaccaridi capsulari di *S. aureus* tipo 5 e 8 15 facoltativamente coniugati ad esotossina A di *Pseudomonas aeruginosa* ricombinante non tossica, come StaphVAX™, o antigeni derivati da proteine di superficie, invasine (leucocidina, chinasi, ialuronidasi), fattori di superficie che inibiscono ingolfamento fagocitico (capsula, Proteina A), carotenoidi, produzione di catalasi, Proteina A, coagulasi, 20 fattore di coagulazione, e/o tossine di danneggiamento a membrana (facoltativamente detossificate) che lisano membrane di cellula eucariotica (emolisine, leucotossine, leucocidina).

Cellule ospiti

[71] L'invenzione fornisce cellule ospiti isolate che 25 comprendono uno o più vettori di espressione dell'invenzione e che

possono essere utilizzate per produrre una proteina di interesse. "Cellule ospiti isolate" secondo l'invenzione sono cellule che sono state rimosse da un organismo e/o sono mantenute *in vitro* in colture sostanzialmente pure.

5 [72] Un'ampia varietà di tipi cellulari possono essere utilizzati come cellule ospiti dell'invenzione, comprese cellule sia procariotiche sia eucariotiche. Le cellule ospiti comprendono, senza limitazione, cellule batteriche, cellule fungine, cellule di lievito, cellule di insetto, e cellule di mammifero. Metodi per l'introduzione di
10 polinucleotidi eterologhi dentro cellule ospiti sono conosciuti nell'arte e comprendono trasfezione mediata da destrano, precipitazione in fosfato di calcio, trasfezione mediata da polibrene, fusione di protoplasto, elettroporazione, incapsulamento del(i) polinucleotide(i) in liposomi, e microiniezione diretta del DNA dentro nuclei.

15 [73] Cellule ospiti batteriche utili comprendono batteri Gram negativi, come *Escherichia coli* [Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128; Amann *et al.* (1985) *Gene* 40:183; Studier *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 e EP-A-0 136 907],
20 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas haloplanctis*, *Pseudomonas putida* AC10, *Pseudomonas pseudoflava*, *Bartonella henselae*, *Pseudomonas syringae*, *Caulobacter crescentus*, *Zymomonas mobilis*, *Rhizobium meliloti*, *Myxococcus xanthus* e batteri Gram positivi come *Bacillus subtilis* [Palva *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Streptococcus cremoris* [Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655];

Streptococcus lividans [Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655], e *Streptomyces lividans* [Brevetto US 4 745 056].

[74] Cellule ospiti fungine utili comprendono *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans*, 5 *Fusarium graminearum*.

[75] Cellule ospiti di muffa mucillaginosa utili comprendono *Dictyostelium* [Arya, et al. (2008) *FASEB J.* 22:4055].

[76] Cellule ospiti di lievito utili comprendono *Candida albicans* [Kurtz, et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142], *Candida maltosa* 10 [Kunze, et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson, et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg et al. (1990) 15 *Bio/Technology* 8:135], *Pichia guillerimondii* [Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg, et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Brevetti US No. 4 837 148 e 4 929 555], *Saccaromiceti*, *Saccaromices cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706], e *Yarrowia lipolytica* 20 [Davidow, et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:380471 Gaillardin, et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49].

[77] Metodi per introdurre DNA esogeno in ospiti di lievito sono ben noti nell'arte, e solitamente comprendono o la 25 trasformazione di sferoplasti o di cellule di lievito intatte trattate con

cationi alcalini. Procedure di trasformazione solitamente variano con le specie di lievito che devono essere trasformate. Vedere per esempio [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Candida]; [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302; Hansenula]; [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:1165; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135; Kluyveromyces]; [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Brevetti US 10 No. 4 837 148 e 4 929 555; Pichia]; [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163 Saccharomyces]; [Beach and Nurse (1981) Nature 300:706; Schizosaccharomyces]; [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10:49; Yarrowia].

15 [78] Cellule ospiti di mammifero comprendono cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), cellule HeLa, cellule di rene di criceto giovane (BHK), cellule di rene di scimmia (COS), cellule umane di carcinoma epatocellulare (per esempio. Hep G2).

20 [79] Ospite di insetto utile comprendono infezione con AcNPV e BmNPV in linea cellulare Sf9 di *Spodoptera frugiperda* o Kc di *Drosophila melanogaster*.

25 [80] I substrati per la biosintesi di HSL mediante *luxI* sono disponibili in entrambe le cellule procariotiche ed eucariotiche. Nella descrizione che segue, LuxI e LuxR vengono utilizzati come esempi; tuttavia, l'invenzione include esplicitamente forme di

realizzazione simili di cellule ospiti in cui viene utilizzato altro macchinario di QS (*per esempio*, proteine tipo LuxR e LuxI come definito sopra, comprese quelle elencate in Tabella 1).

5 [81] In un aspetto dell'invenzione, la cellula ospite viene trasformata in modo tale che essa codifichi per un gene di *luxI* funzionale, un gene di *luxR* funzionale ed un promotore di *luxI* funzionale operativamente collegato ad un gene di interesse. La trasformazione può essere effettuata utilizzando qualsiasi metodo conosciuto nell'arte, come quelli discussi sopra. Durante la coltura di 10 cellula ospite, viene espresso il gene di *luxI* avendo come risultato l'accumulo di quantità dell'auto-induttore HSL. Ad una concentrazione di soglia di HSL, correlata ad una densità di cellula ospite desiderata, l'espressione del gene di interesse viene attivata attraverso il legame del complesso di auto-induttore HSL/LuxR al promotore di *luxI*.

15 [82] In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una cellula ospite che comprende un gene di *luxI* integrato nel genoma. In una forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, la cellula ospite comprende anche *luxR* e comprende inoltre un vettore di espressione che codifica per un gene di interesse operativamente collegato ad un 20 promotore che risponde ad induzione da parte del complesso di auto-induttore di LuxR. Il gene di *luxR* può essere presente nel vettore o in alternativa integrato nel genoma della cellula ospite. In questa maniera, la cellula ospite viene configurata in modo tale che l'espressione di *luxI* abbia come risultato la produzione dell'auto-induttore HSL, che regola

positivamente l'espressione del gene di interesse quando l'auto-induttore raggiunge una concentrazione di soglia.

[83] In ancora un ulteriore aspetto, l'invenzione è una cellula ospite che comprende un gene di *luxR* eterologo integrato nel genoma. In una forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, la cellula ospite comprende anche un gene di *luxI* ed inoltre comprende un vettore codificante per un gene di interesse operativamente collegato ad un primo promotore che risponde ad induzione da parte del complesso di auto-induttore di LuxR. Il gene di *luxI* può essere presente nel vettore o in alternativa integrato nel genoma della cellula ospite. In questa maniera, la cellula ospite è configurata in modo tale che l'espressione di LuxI abbia come risultato la produzione dell'auto-induttore HSL, che è capace di regolare positivamente l'espressione del gene di interesse quando l'auto-induttore raggiunge una concentrazione di soglia.

[84] L'integrazione di *luxI* nel genoma della cellula ospite riduce il dosaggio di gene di *luxI* ad una copia per cellula. Come dimostrato negli Esempi sottostanti, l'integrazione di *luxI* nel genoma di cellula ospite ha l'effetto di incrementare la densità cellulare di soglia necessaria per l'attivazione genica in modo tale che possa essere ottenuto un livello più elevato di crescita cellulare per la produzione ottimale della proteina ricombinante. Una maniera in cui l'integrazione genomica di *luxI* può portare questo vantaggio è attraverso il permesso di un accumulo più lento e controllabile di auto-induttore. Avere *luxI* nel genoma significa che la dose di gene è controllata, regolando in tal

modo la produzione di HSL. Quando è presente *luxI* in un vettore, invece, numeri di copie elevate di questo gene possono avere come risultato una produzione più rapida di HSL abbassando in tal modo la densità di soglia necessaria per l'auto-induzione.

5 [85] Un altro vantaggio è che il dosaggio di gene di *luxI* ed il dosaggio del gene di interesse possono essere controllati indipendentemente in modo tale che da un lato possa essere ottenuto un numero di copia specifico del gene di *luxI* ed un numero di copia specifico dall'altro. In altre forme di realizzazione il numero di copia di
10 un gene eterologo può essere considerato autonomamente senza influire sul controllo della regolazione del sistema di espressione.

15 [86] In altre forme di realizzazione una cellula ospite comprende un gene di *luxR* eterologo integrato stabilmente nel genoma della cellula ospite. LuxR è un elemento necessario del complesso di auto-induttore LuxR/HSL e pertanto il dosaggio di gene di questo gene è atteso avere come risultato gli stessi vantaggi discussi sopra, quando *luxI* è integrato nel genoma.

20 [87] In ancora altre forme di realizzazione una cellula ospite comprende entrambi un gene di *luxR* eterologo ed un gene di *luxI* eterologo, che sono entrambi integrati stabilmente nel genoma della cellula ospite.

25 [88] “Integrato stabilmente” come utilizzato qui significa che i geni eterologhi che codificano per proteine tipo LuxR e/o tipo LuxI sono incorporati dentro il DNA genomico della cellula ospite e possono essere passati nelle cellule figlie per almeno svariate generazioni.

L'integrazione stabile può essere realizzata mediante metodi ben conosciuti nell'arte. Vedere Esempi 8.

Espressione di proteine di interesse ricombinanti

[89] Metodi per produrre proteine di interesse secondo

5 l'invenzione possono essere utilizzati su una scala piccola o grande. Una qualsiasi delle cellule ospiti descritte sopra può essere coltivata in condizioni che permettono l'espressione delle proteine codificate. Per esempio, in una forma di realizzazione, la cellula ospite comprende un vettore che comprende (i) un primo gene di interesse eterologo operativamente collegato ad un primo promotore che risponde alla 10 induzione da parte del complesso di auto-induttore di LuxR; e (ii) un secondo promotore inducibile che guida l'espressione di un secondo gene in modo tale che l'espressione del secondo gene interferisca con l'espressione del gene di interesse eterologo, in cui detta cellula ospite comprende anche un gene di *luxI* eterologo ed un gene di *luxR* eterologo. Preferibilmente, *luxI* e/o *luxR* sono integrati nel genoma, tuttavia entrambi o uno di questi geni possono in alternativa essere presenti in un vettore all'interno della cellula ospite. Preferibilmente, il processo di coltura di cellula ospite ha come risultato l'espressione dei geni di *luxI* e 15 *luxR* cosa che a sua volta ha come risultato la produzione del complesso di auto-induttore di LuxR e l'attivazione della espressione del gene di interesse quando l'auto-induttore raggiunge una concentrazione di 20 soglia.

[90] In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un processo

25 come definito sopra che comprende inoltre (i) una fase di inoculo per

5 preparare un inoculo della cellula ospite in condizioni che sopprimono l'espressione del gene di interesse; e (ii) una fase di coltura in cui una coltura di cellula ospite viene preparata utilizzando l'inoculo ed in cui l'espressione del gene di interesse viene auto-indotta durante la coltura ad un livello di densità cellulare di soglia.

10 [91] In una forma di realizzazione di questo processo la cellula ospite comprende un vettore comprendente (i) un primo gene di interesse eterologo operativamente collegato ad un primo promotore che risponde alla induzione da parte del complesso di auto-induttore di LuxR; e (ii) un secondo promotore inducibile che guida l'espressione di un secondo gene in modo tale che l'espressione del secondo gene interferisca con l'espressione del gene eterologo, ed in cui la soppressione del gene di interesse durante la fase di inoculo viene conseguita inducendo l'attivazione del secondo promotore inducibile.

15 [92] In un altro aspetto, l'invenzione è basata sulla realizzazione che un controllo efficace della espressione di gene ricombinante può essere determinato attraverso l'implementazione di un processo a più fasi, in cui nella prima fase, l'espressione genica viene soppressa in maniera efficace, persino in condizioni di densità 20 cellulare elevata, ed in cui nella seconda fase, l'espressione genica viene innescata attraverso l'auto-induzione. In maniera più specifica, gli inventori hanno stabilito che reprimendo l'espressione genica nella prima fase, può essere preparato un inoculo ad elevata densità di cellule ospiti senza innescare la produzione di proteina ricombinante.

25 Successivamente, facendo uso del macchinario di QS descritto sopra, le

cellule ospiti possono essere coltivate dall'inoculo iniziale fino a quando viene raggiunta una densità cellulare ottimale, al quale punto, avverrà l'auto-induzione della espressione genica avendo come risultato la produzione della proteina ricombinante.

5 Produzione su larga scala

[93] In una forma di realizzazione la proteina di interesse può essere prodotta mediante un processo su larga scala utilizzando fermentazione ed un sistema di espressione dell'invenzione. Le cellule ospiti possono essere cresciute utilizzando sistema di coltura *in batch* in cui il tasso di crescita, i nutrienti, e le concentrazioni metaboliche possono essere modificati durante il processo di crescita. In un'altra forma di realizzazione, le cellule ospiti vengono cresciute utilizzando un processo in *fed-batch* in cui viene definita la composizione del terreno all'inizio del processo e quindi i nutrienti vengono aggiunti se necessario durante il processo di crescita. In un'altra forma di realizzazione, le cellule ospiti vengono cresciute utilizzando un processo in continuo in cui la coltura viene mantenuta nella fase di crescita esponenziale mediante l'aggiunta continua di terreno fresco che viene bilanciata dalla rimozione di sospensione cellulare dal bioreattore.

20 [94] Il processo di coltura complessivo può essere diviso in svariati stadi, comprendenti differenti fasi (*batch*, *fed-batch* ed alimentazione di carbonio). Per esempio, un processo di coltura complessivo utilizzato per la produzione di proteina ricombinante utilizzando un sistema di espressione di QS dell'invenzione può 25 comprendere le seguenti fasi: a) una fase iniziale di pre-inoculo, b) una

fase di inoculo in cui i batteri iniziano a crescere, c) una fase di espressione della proteina di interesse, d) una fase di raccolta delle cellule, e) purificazione della proteina.

a. Fase di pre-inoculo. Questa fase consente la crescita di batteri ad elevata densità con il conseguimento di un pre-inoculo molto denso con una OD da circa 5-6 fino a circa 10 (*per esempio, 5, 5,5, 6, 6,6, 7, 8, 9, 10*). Durante questa fase, è raccomandata l'inibizione di sintesi della proteina di interesse. La fase di pre-inoculo può essere effettuata per esempio in un sistema *in batch*.

b. Fase di inoculo. Il pre-inoculo viene diluito in terreno fresco, per esempio con un fattore di diluizione da 100 a 1000 (*per esempio, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000*). Anche il volume del fermentatore viene incrementato. Durante questa fase i batteri iniziano a crescere, e l'espressione di proteina dovrebbe essere inibita. La fase di inoculo può essere effettuata in un sistema *in fed-batch* ma non è limitata da questo metodo di coltura. In alcune forme di realizzazione il *fed-batch* può essere effettuato aggiungendo glucosio da 1 g/l a 5g/l (*per esempio, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, o 5 g/l*).

c. Fase di espressione. Quando la densità cellulare raggiunge una certa densità ottica desiderata (*per esempio, 2-3 OD*), le condizioni di crescita possono essere modificate cambiando il pH, a causa dell'esaurimento di alcuni nutrienti (*per esempio, glucosio*), e l'espressione della proteina può iniziare. Il pH può essere impostato, per esempio, da 6,2 a 7,8 (*per esempio, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9*,

7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8). L'espressione della proteina può avere luogo da una OD di da 3 a 30 (per esempio, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30), che corrisponde ad una fase stazionaria.

5 Inibizione della sintesi di proteina in un inoculo

[95] Un problema incontrato utilizzando lo stadio di pre-coltura in fermentazione industriale in un sistema di auto-induzione è che la densità cellulare può essere molto elevata, cosa che attiva il sistema di espressione di auto-induzione dell'invenzione, che produce la proteina ricombinante di interesse. A questo stadio del processo, tuttavia l'espressione della proteina ricombinante non è raccomandata dal momento che, per esempio, la proteina di interesse potrebbe compromettere la vitalità dei batteri e la produzione della proteina in un bioreattore (Grossman *et al.*, 1998. Gene 209 95–103). Dal momento che i sistemi di quorum sensing sono indotti dalla densità cellulare, è preferibile comprendere un sistema di repressione in fasi di pre-coltura. Pertanto, una forma di realizzazione dell'invenzione comprende l'introduzione di un sistema accessorio che reprime l'auto-induzione quando la densità cellulare è elevata. Questa forma di realizzazione dell'invenzione utilizza vettori di espressione descritti sopra che si basano sulla interferenza trascrizionale.

[96] Un altro problema è l'espressione prematura della proteina eterologa durante lo stadio precoce della fase di crescita (fase di inoculo). La repressione catabolica potrebbe essere utilizzata per reprimere il sistema di auto-induzione. È noto che la presenza di

glucosio nel terreno di coltura reprime la fluorescenza dell'operone di *lux* in *E. coli* (Dunlap and Kuo (1992) *J. Bacteriol.* 174:2440-8). Il glucosio può essere aggiunto in culture in *fed-batch* durante la fase precoce di crescita, per esempio ad una concentrazione che varia da 5 1g/l a 5 g/l. In una forma di realizzazione, dopo l'esaurimento di glucosio e ad una densità cellulare sufficiente, la proteina eterologa può essere espressa. La fonte di carbonio dopo il consumo del glucosio può essere, per esempio, glicerolo, fruttosio, lattosio, saccarosio, maltodestrine, amido, inulina, oli vegetali come olio di soia, idrocarburi, 10 alcoli come metanolo ed etanolo, acidi organici come acetato e melassa.

[97] In seguito alla coltura (*per esempio, in batch, in feed-batch* o in coltura continua), possono essere utilizzati ulteriori stadi di processamento per purificare la proteina di interesse. Tali metodi sono ben conosciuti nell'arte e comprendono cromatografia ad esclusione 15 dimensionale, frazionamento in solfato di ammonio, cromatografia a scambio ionico, cromatografia di affinità, ed elettroforesi su gel preparativo. Una preparazione di proteine di interesse purificate è almeno all'80% pura; preferibilmente, le preparazioni sono al 90%, 95%, o 99% pure. La purezza delle preparazioni può essere valutata mediante 20 qualsiasi mezzo conosciuto nell'arte, come elettroforesi su gel di SDS-poliacrilammide.

Prodotti

[98] In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una proteina ricombinante, un vaccino o una composizione farmaceutica 25 ottenuto o ottenibile mediante uno o più dei metodi divulgati sopra.

[99] Composizioni farmaceutiche dell'invenzione comprenderanno tipicamente, in aggiunta ai componenti menzionati sopra, uno o più "trasportatori accettabili dal punto di vista farmaceutico". Questi comprendono qualsiasi trasportatore che non 5 induce esso stesso la produzione di anticorpi nocivi per l'individuo che riceve la composizione. Trasportatori adeguati sono macromolecole tipicamente grandi, metabolizzate lentamente come proteine, polisaccaridi, acidi polilattici, acidi poliglicolici, amminoacidi polimerici, copolimeri di amminoacido, ed aggregati di lipide (come gocce di olio o 10 liposomi). Tali trasportatori sono ben noti dai tecnici del ramo. Una composizione può anche contenere un diluente, come acqua, soluzione salina, glicerolo, eccetera. In aggiunta, possono essere presenti una sostanza ausiliare, come un agente umettante o emulsionante, una sostanza di tamponamento di pH, e simili. Una discussione 15 approfondita di componenti accettabili dal punto di vista farmaceutico è disponibile in Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20a ed., ISBN: 0683306472.

[100] Composizioni di vaccino dell'invenzione possono essere somministrate in congiunzione con altri agenti 20 immunoregolatori. In particolare, le composizioni solitamente comprenderanno un adiuvante. Adiuvanti per l'utilizzo con l'invenzione comprendono, ma non sono limitati a, composizioni contenenti minerale (*per esempio*, sali di minerale, come sali di alluminio e sali di calcio), emulsioni in olio (*per esempio*, MF59 (Squalene al 5%, TWEEN™ 80 allo 25 0,5%, e Span 85 allo 0,5%, formulati in particelle submicrometriche

utilizzando un microfluidificatore), formulazioni di saponina (*per esempio*, QS21 e ISCOM), virosomi e particelle simili a virus (VLP), derivati batterici e microbici (*per esempio*, derivati non tossici di lipopolisaccaride enterobatterico, derivati di lipide A, oligonucleotidi 5 immunostimolatori, tossine ADP-ribosilanti e loro derivati detossificati, bioadesivi e mucoadesivi, microparticelle, liposomi, etere di poliossalilene e formulazioni di etere di poliossalilene, polifosfazene (PCPP), peptidi di muramile, composti di imidazochinolina, composti di tiosemicarbazone, e composti di triptantrina, ed immunomodulatori 10 come IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, interferoni come interferone- γ , fattore stimolante la colonia di macrofago, e fattore di necrosi di tumore.

[101] Tutti i brevetti, le domande di brevetto, e i riferimenti citati in questa divulgazione vengono espressamente 15 incorporati qui a titolo di riferimento. La divulgazione di cui sopra descrive generalmente la presente invenzione. Una comprensione più completa può essere ottenuta mediante riferimento ai seguenti esempi specifici, che vengono forniti per fini unicamente illustrativi e non sono intesi limitare la portata dell'invenzione.

ESEMPIO 1

Ceppi di cellula ospite e condizioni di crescita

[102] Caratteristiche di ceppi batterici utilizzati in questi Esempi vengono riassunte in Tabella 4.

5

Tabella 4.

| Ceppo | Caratteristiche |
|-------------------------------------|---|
| <i>V. fischeri</i> (ATCC 7744) | |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F $^+$ Φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r $^+$ _k , M $^+$ _k) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ- |
| <i>E. coli</i> TOP10 | F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str r) endA1 nupG |
| <i>E. coli</i> MM294.1 (ATCC 39515) | F $^+$ supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda- |
| <i>E. coli</i> MM294.1::luxI | F $^+$ supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda- metW::ery\luxI |
| BL21(DE3) | F $^+$ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B $^+$ m _B $^+$) I(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) |

[103] Ceppi di *E. coli* sono stati cresciuti in terreno liquido e solido. Terreno solido è stato ottenuto aggiungendo agar all'1,5% a

terreno liquido. Sono stati utilizzati i seguenti terreni liquidi: LB (Bactotriptone all'1%, estratto di lievito allo 0,5%, NaCl allo 0,5%), YE3x (estratto di lievito 45 g/l, KH₂PO₄ 4 g/l, K₂HPO₄ 16 g/l, glicerolo 15 g/l), terreno minimo: (NH₄)₂SO₄ 3 g/l, MgSO₄ 1 mM, tiammina 1 mM, 5 FeSO₄, MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, CuSO₄, ZnSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 4 g/l, K₂HPO₄ 16 g/l, glicerolo 15 g/l). I ceppi sono stati cresciuti a 25°C, 30°C, o 37°C.

[104] *V. fischeri* sono stati cresciuti nel terreno LBS contenente 10 g of BactoTriptone-Peptone, 5 g di estratto di lievito, 10 50 ml di Tris base 1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a pH 7,5, e NaCl 20 g/l a 28°C (McCann et al., 2003, Appl Environ Microbiol 69:5928-34).

Fermentazione in *batch*

[105] Il terreno utilizzato per la fermentazione in *batch* era YE3× (estratto di lievito 45 g/l, KH₂PO₄ 4 g/l, K₂HPO₄ 16 g/l, glicerolo 15 g/l), terreno minimo (NH₄)₂SO₄ 3 g/l, MgSO₄ 1 mM, tiammina 1 mM, 5 FeSO₄, MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, CuSO₄, ZnSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 4 g/l, K₂HPO₄ 16 g/l, glicerolo 15 g/l). Gli antibiotici (per esempio, ampicillina o kanamicina) sono stati aggiunti al terreno se necessario. La fase di crescita è stata effettuata a 25°C ed a pH di 6,2 o 7,2 (±0,1). La concentrazione di ossigeno dissolto è stata mantenuta al di sopra del 10 punto di impostazione di 40%. L'aria è stata rifornita ad un tasso fissato di 0,5VVM (volume di gas/volume di liquido x minuti). Quando il valore di ossigeno dissolto è caduto al valore del punto di impostazione, la concentrazione minima (40%) è stata mantenuta controllando in cascata il tasso di agitazione da 200 a 800 rpm e successivamente 15 l'aggiunta di ossigeno molecolare da 0-0,05VVM.

[106] La crescita cellulare è stata monitorata leggendo la densità ottica a 590 nm (spettrofotometro Beckman) di campioni presi ogni ora. Questi campioni sono stati utilizzati per svariate analisi. La produzione di proteine ricombinanti è stata realizzata in bioreattori di 2 20 e 5 litri di volume di lavoro (Applikon Analytical B.V., Ac Schiedam, Netherlands). I parametri di agitazione, pH, ossigenazione e temperatura sono stati seguiti utilizzando ADI 1030 (Applikon) ed il programma Bioexpert (Applikon) per un monitoraggio continuo di questi parametri.

Misurazioni di fluorescenza

[107] La fluorescenza delle colture batteriche è stata monitorata utilizzando la classificazione di cellula attivata da fluorescenza (FACS) e mediante fluorimetro a lettore di piastra (Infinite 5 M200-Tecan).

[108] *Saggio di FACS.* I campioni sono stati presi in svariati punti nella fase di crescita per l'analisi di fluorescenza mediante FACS (LSR-II, Becton-Dickinson). I campioni sono stati standardizzati ad una OD of 0,5 mediante centrifugazione a 6000 x g per 5 minuti. 10 Dopo due lavaggi in PBS, i pellet sono stati risospesi nel medesimo volume di PBS con formaldeide al 2%. I campioni sono stati incubati 20 minuti a temperatura ambiente, quindi lavati due volte con PBS e conservati a 4°C fino all'analisi di FACS.

[109] Sono stati acquisiti da cinque a diecimila eventi per 15 ciascun campione. I risultati sono stati analizzati tramite l'utilizzo del programma di elaboratore elettronico FlowJo (Tree Star). Il controllo negativo è stato la coltura di *E. coli* BL21(DE3)\pET21b. Il controllo positivo è stato la coltura di *E. coli* BL21(DE3)\pET21b-gfp (vedere Tabelle 3 e 4 per ceppo e caratteristiche di vettore). Entrambi i ceppi di 20 controllo di *E. coli* sono stati cresciuti sotto ciascuna delle condizioni sperimentali utilizzate ed indotti con IPTG 1 mM alla densità ottica di 0,5 ad 590 nm. Le cellule sono state raccolte due ore dopo l'induzione.

Saggio di fluorimetro su piastre a microtitolo

[110] La fluorescenza è stata anche misurata durante la 25 crescita delle culture utilizzando Infinite M200 (Tecan) a micropiastra.

Le concentrazioni dei ceppi di *E. coli* sono state normalizzate
crescendole per una notte. I saggi sono stati effettuati almeno in
triplicato e standardizzati ad una densità ottica di 0,01 a 590 nm in
terreni M9, LB, e YE3X in presenza di antibiotici. La temperatura e
5 l'agitazione sono state controllate durante la crescita, e la fluorescenza è
stata misurata in linea con una onda di eccitazione a 460 nm, una onda
di emissione a 510 nm, e l'assorbanza a 590 nm.

ESEMPIO 2

Costruzione di plasmide

10 [111] Caratteristiche di plasmidi vengono descritte in
Tabella 5.

Tabella 5.

| Plasmide | Caratteristiche |
|---------------------------------|--|
| pGlow TOPO | Vettore di clonaggio TA per prodotti di PCR; origine di pBR322Neo ^r Apr ^r , origine di f1, promotore di T7, orf di gfp |
| pGlow TOPO+ <i>metE::ery</i> | pGlow con gene di <i>metE</i> interrotto da Ery ^r |
| pGllux506 | pGlow con frammento di PCR di luxR-luxI e gfp in orf con <i>P_{luxI}</i> |
| pCRII | Vettore di clonaggio TA per prodotti di PCR; KanR, AmpR. Origine di pUC, origine di f1, lacZa |
| pCRII MHTT | Frammento di pCRII- MHTT |
| pCR-MT | Frammento di pCRII- MT |

| | |
|---|---|
| pCRII- <i>luxR_{TTA}\luxC_{ATG}</i> -AatII | MluI- Frammento di pCRII- <i>luxR_{TTA}\luxC_{ATG}</i> con siti di restrizione di MluI e AatII |
| pLAIR32 | Frammento di pCRII- MT-luxR-luxI |
| pLAIR42 | Frammento di pCRII- MHTT-luxR-luxI |
| pLAIET32 | Ori pBR322 Amp ^r frammento di MT-luxR-luxI |
| pMKSal | Ori pBR322, Kan ^r , promotore di T7, luxI-ottimizzato, luxR-ottimizzato. |
| pMKSal-GFP | pMKSal, gfp in orf con <i>P_{luxI}</i> |
| pMKSal-ΔluxI- | pMKSal con <i>luxI</i> troncato utilizzando siti di KpnI |
| pMKSal-ΔluxI-GFP | pMKSal-ΔluxI-; gfp in orf con <i>P_{luxI}</i> . |
| pKOBEG | Espressione dei geni <i>gam</i> , <i>bet</i> e <i>exo</i> per permettere la ricombinazione omologa |
| pGLEM | Neor ^r Apr ^r , origine di pBR322, origine di f1, promotore di T7 |
| pGLEM-luxI | gfp orf, gene di metE interrotto da Ery ^r , pGLEM-luxI in sito di AscI |
| pET21 | |
| pET21-GFP | pET21 con gfp in orf con promotore di p7 |

[112] Amplificazione del gene di *gfp*. Il gene di *gfp* è stato amplificato da pGlow (Invitrogen) utilizzando una miscela di primer GFPEcoRI/GFPNotI (vedere Tabella 6).

Tabella 6.

| Primer | Sequenza | SEQ ID NO: |
|------------------------------|--|---------------|
| LuxFr | AAGCTTACTTACGTACTTAACCTTTA | 98 |
| LuxRv | TCATTATTCCCCCTATAATATACTTAGT | 99 |
| LFrMluIT | TTTACCGCGTTACTTACGTACTTAACCTTTA | 100 |
| LRvAatIT | TTTGACGTCTTCATTATTCCCCCTATAATATA | 101 |
| pETORIAMP _{Mlu} IFr | TTTACCGCGTGAGAAGCAGGCCATTATCGC | 102 |
| pETORIAMP _{Nde} IRv | TTTCATATGATTCAGGTGGCACTTTCG | 103 |
| GFPEcoRI | GAATTCAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACT | 104 |
| GFPNotI | GCGGCCGCTTATTGTAGAGCTCATCCA | 105 |
| GFPEcoRII | GAATTCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAC | 106 |
| LxIAsclF | TTTGGCGCGCCATTATTCCCCCTATAATATACTTAGTA | 107 |
| LxIAsclR | TTTGGCGCGCCTAAACCGTAATAGATTGACA | 108 |
| metEL | GAAAAGTACTGCTGTAGCGTTTCAGGTG | 109 |
| LuxRv | GAAAAGTACTGGGAAGAAGTCGCTGTAATG | 110 |
| LFrMluIT | TCAAATGTCAATCTATTACCG | 111 |
| LRvAatIT | TCCTTACCTATTGTTGTCG | 112 |

[113] Il frammento è stato digerito mediante gli enzimi di restrizione *Eco*RI e *Not*I ed è stato clonato in differenti plasmidi come 5 pMKSaI, pMKSaI- Δ luxI, pET21 che vengono descritti in Tabella 5.

[114] pGLlux506. Il frammento *luxR*_{TTA}*luxC*_{ATG} dell'operone di *lux* (FIG. 1) che comprende il gene *luxR*, *luxI*, la regione intergenica tra *luxR*-*luxI*, e la regione *luxI*-*luxC* è stato amplificato da

genoma di *V. fischeri* ATCC7744 utilizzando una miscela di primer LuxFr\LuxRv (Tabella 6). Il frammento *luxR_{TTA}\luxC_{ATG}* contiene codone ATG del gene di *luxC* che è in cornice con il gene reporter di *gfp* quando introdotto al sito TA nel vettore pGLOW (Invitrogen). Questo nuovo 5 vettore viene chiamato pGLlux506. *E. coli* MM294.1 viene trasformato con il vettore pGLlux506. L'espressione del gene di *gfp* è sotto il controllo del promotore di *luxI* (**FIG. 2**), cosa che significa che l'espressione di proteina di Gfp è dipendente dalla densità cellulare.

10 **[115]** Fluorescenza, come misurata mediante FACS (infinite M200-Tecan) di cellule a differenti stadi di crescita, è stata mostrata chiaramente solamente quando la OD ha raggiunto un livello di soglia. L'induzione della sintesi di Gfp viene osservata tra una densità ottica tra 0,5 e 0,7. Questo risultato indica che una grande quantità di 15 proteina può essere prodotta mediante questo sistema di auto-induzione.

[116] Vettore pLAIET32. La costruzione del vettore pLAIET32 viene riassunta in **FIG. 3**.

20 **[117]** Il frammento di MT è stato assemblato utilizzando PCR di assemblaggio come descritto in Rydzanicz et al. (2005, Nucleic Acids Research, 33:W521–W525) ed utilizzando il programma “Assembly PCR oligo maker”, accessibile sul seguente sito internet (publish.yorku.ca/~pjohson/AssemblyPCRolligomaker.html). La sequenza di MT designata è stata inserita nel programma con i seguenti 25 parametri: concentrazione di catione monovalente (50 mM), concentrazione di DNA (0,5 µM), massima lunghezza di oligonucleotide

calcolata (50), temperatura di appaiamento (55°C), temperatura di fusione accettabile per sovrapposizione (40°C). Quindi le sequenze dei differenti primer per PCR di assemblaggio e per la PCT di lunghezza intera sono state date (vedere Tabella 7). Apo R e Apo F sono i primer 5 fiancheggianti e Apo 1-6 sono gli oligonucleotidi di assemblaggio.

Tabella 7

| Primer | Sequenza | SEQ ID NO |
|--------|---|-----------|
| Apo1 | TTTTAAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGAAG | 113 |
| Apo2 | GGCCGCTCGAGTCGACGGAATTCTCGACGTCTGGTACCA | 114 |
| Apo3 | GTCGACTCGAGCGGCCGCGTGAUTGACTGAAGATCTACTAGTAG | 115 |
| Apo4 | CTGAGCCTTCGTTTATTGAAAGCTACTAGTAGATCTCAGTCAGTC | 116 |
| Apo5 | CTTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTGGGCCTTCGT | 117 |
| Apo6 | AAAACATATGCAGATTAAAACGAAAGGCCAGTCTTGC | 118 |
| ApoF | TTTTAAGCTTACGCGTGGTACC | 119 |
| ApoR | AAAACATATGCAGATTAAAACGAAAGGC | 120 |

[118] Il frammento di MT ottenuto mediante PCR 10 assemblante è stato inserito nei siti di TA nel plasmide (Invitrogen) (FIG. 3) ed il nuovo vettore è stato chiamato pCRII-MT. In parallelo, il frammento di *luxR_{TTA}\luxC_{ATG}* è stato sotto-clonato nel vettore pCRII utilizzando i primer LFrMluIT\LRvAatII (Tabella 6) per ottenere il vettore pCRII- MluI*luxR_{TTA}\luxC_{ATG}*AatII. Il vettore pCRII-MT è stato ottenuto.

[119] Il frammento che contiene la ori di pBR322 ed il gene di *bla* per la resistenza ad ampicillina è stato amplificato con

primer pETORIAMPMluIFr\pETORIAMPNdeIRv da plasmide pET21. Il prodotto di PCR è stato digerito mediante enzimi di restrizione MluI\NdeI e ligato con il frammento MluI\NdeI da plasmide pLAIR32, per ottenere il plasmide pLAIET32.

5 [120] Lo stesso protocollo è stato utilizzato per il frammento di MHTT che differisce dal frammento di MT per la presenza di un tag di istidina e la presenza nella sequenza di un sito di taglio per la proteasi Tev. Le sequenze dei differenti primer per PCR di assemblaggio e per la PCT di lunghezza intera sono state date (vedere 10 Tabella 8). ApoFRv e ApoFFr sono i primer fianchegianti e Apom 1-6 sono gli oligonucleotidi di assemblaggio. I vettori sono stati nominati pLAIR42 e pLAIET42.

Tabella 8.

| Primer | Sequenza | SEQ NO | ID |
|---------|---|-----------|----|
| Apom1 | TTTTAAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGCATCATCATCA | 121 | |
| Apom2 | CTTGCCTGGAAAGTACAGGTTTCGTGATGATGATGATGATG CGACGTCTTGG | 122 | |
| Apom3 | AACCTGTACTTCCAGGGCAAGAATTCCGTCGACTCGAGCGG CCGCGTG | 123 | |
| Apom4 | TTCGTTTATTGAAAGCTACTAGTAGATCTTCAGTCAGTCAC GCGGCCGCTC | 124 | |
| Apom5 | AAGATCTACTAGTAGCTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTG CAAAGACTGGGCCT | 125 | |
| Apom6 | AAAACATATGCAGATTAAAACGAAAGGCCAGTCTTGCACT | 126 | |
| ApomFFr | TTTTAAGCTTACGCGTGGTACC | 127 | |
| ApomFRv | AAAACATATGCAGATTAAAACGAAAGGC | 128 | |

EXAMPLE 3

Repressione del sistema di auto-induzione a densità cellulare elevata

- 5 [121] L'inibizione del sistema di auto-induzione a densità cellulare elevata è stata ottenuta inibendo l'espressione di *luxR*. Per questo fine, un promotore inducibile (qui, il promotore di T7) è stato inserito a monte del gene di *luxR* ed in un orientamento convergente rispetto al promotore del gene di *luxR* (FIG. 4A) nel vettore di
10 espressione auto-inducibile. Questo vettore è stato introdotto nel ceppo di *E. coli* BL21DE3, dove il promotore di T7 è stato inducibile mediante

l'aggiunta di IPTG nel terreno ed è stata testata la repressione di *luxR* mediante interferenza trascrizionale.

[122] I ceppi BL21DE3 e di controllo negativo Top10 di *E. coli* (Tabella 4) sono stati cresciuti su LB agar in assenza o in presenza 5 di IPTG 1mM. Cellule BL21DE3 in assenza di IPTG hanno mostrato una forte fluorescenza mentre in presenza di IPTG il livello di fluorescenza è stato lo stesso del controllo negativo. L'induzione del promotore di T7 in ceppi BL21DE3 che sono stati cresciuti su LB agar con IPTG 1mM ha represso l'espressione di *luxR*; di conseguenza il sistema di auto-10 induzione e conseguentemente l'espressione della proteina di Gfp è stata anche repressa (FIG. 4B). Il sistema di repressione di *luxR* tramite interferenza trascrizionale è stato trovato essere accordabile ed adeguato per la repressione del sistema di espressione di auto-induzione a densità cellulare elevata.

15 ESEMPIO 4

Ottimizzazione di sequenza di *luxR* e *luxI* per l'espressione in *E. coli*

[123] Ottimizzazione di sequenze di *luxI* e *luxR* per l'espressione in *E. coli*. Le sequenze di *luxI* e *luxR* sono state ottimizzate 20 al fine di incrementare l'espressione del macchinario di QS. Analisi NTI di vettore della sequenza di nucleotide ha mostrato che la traduzione di mRNA di *luxR* e *luxI* richiede l'utilizzo di tRNA raro in *E. coli*. La sequenza amminoacidica di proteine di LuxI e LuxR sono state retro-tradotte utilizzando Tabella 9.

Tabella 9

| Amino Acid | Codon | Amino Acid | Codon |
|------------|-------|------------|-------|
| Ala (A) | GCT | Met (M) | ATG |
| Cys (C) | TGC | Asn (N) | AAC |
| Asp (D) | GAC | Pro (P) | CCG |
| Glu (E) | GAA | Gln (Q) | CAG |
| Phe (F) | TTC | Arg (R) | CGT |
| Gly (G) | GGT | Ser (S) | TCT |
| His (H) | CAC | Thr (T) | ACC |
| Ile (I) | ATC | Val (V) | GTT |
| Lys (K) | AAA | Trp (W) | TGG |
| Leu (L) | CTG | Tyr (Y) | TAC |
| | | Stop (*) | TGA |

[124] La sequenza di *luxI* ottimizzata (SEQ ID NO:134) (FIG. 5B) ha svariate modificazioni di codone ed è al 74,742 % identica alla sequenza originale di *luxI* (FIG. 5A). Il contenuto di GC della sequenza 5 originale è stato 32%, e quello della sequenza ottimizzata è 45%. Sono stati introdotti due siti di restrizione enzimatica, per KpnI e XbaI.

[125] Analogamente, la sequenza di *luxR* ottimizzata (SEQ ID NO:133) (FIG. 6B) ha svariate modificazioni di codone ed è al 74,235% identica alla sequenza originale di *luxR* (FIG. 6A). Il contenuto 10 di GC della sequenza originale è stato 30%, e quello della sequenza ottimizzata è 45%.

[126] Costruzione di vettore pMKSaI. Un frammento di DNA contenente il promotore di T7, il gene di *luxR* ottimizzato, la regione intergenica *luxR-luxI*, il gene di *luxI* ottimizzato, un sito di 15 clonaggio multiplo (MCS), ed un terminatore della trascrizione è stato disegnato e sintetizzato. Questo frammento è stato inserito dentro un vettore pMK, che ha un gene di resistenza a kanamicina, utilizzando siti

di clonaggio di Ascl e PacI. Questo ha avuto come risultato un nuovo vettore, pMKSal (**FIG. 7A**). pMKSal ha una origine di replicazione di ColE1. Il MCS viene derivato dal MCS del plasmide pET21a, che è compatibile per il clonaggio utilizzando differenti vettori di espressione **5** (**FIG. 7B**). Il promotore T7 viene orientato in maniera convergente rispetto a *luxR*. Le sequenze di *luxR* e *luxI* sono le sequenze ottimizzate di *luxR* e *luxI*. La regione intergenica tra i due geni *luxR* e *luxI* non è stata modificata. Il MCS è a valle del gene di *luxI* e permette **10** l'inserimento del gene di interesse eterologo per la produzione della proteina ricombinante. Il gene di *gfp* (SEQ ID NO:150) è stato inserito nel MCS di pMKSal come descritto sopra e viene chiamato pKMSal-GFP. Il gene di *gfp* è sotto il controllo del promotore indotto da LuxR/auto-
induttore.

[127] Il pMKSal-GFP mostra un livello di espressione **15** elevato rispetto al vettore che ha ospitato le sequenze di *luxR* ((SEQ ID NO:77) e *luxI* native (SEQ ID NO:76) con pLAIET32. La fluorescenza è stata misurata a due concentrazioni cellulari differenti, corrispondenti allo stadio di pre-induzione (OD= 0,5 a 590 nm) e lo stadio di induzione (OD=10 a 590 nm), rispettivamente. Il livello di fluorescenza, che riflette **20** la sintesi della Gfp, è 2,5 più elevatp della espressione del pLAIET32-GFP (**FIG. 8**). Il pLAIET32-GFP ed il pMKSal-GFP vengono considerati essere vettori equivalenti. Essi hanno la stessa origine di replicazione, la dimensione del vettore è approssimativamente la stessa (pMKSal 4231 bp, pLAIET32 4665). Questi vettori differiscono per la resistenza ad **25** antibiotico e per il loro MCS.

[128] Il vettore pMKSal che ospita i geni di *luxR* e *luxI* ottimizzati è stato dimostrato essere un vettore molto efficiente per la produzione di proteine ricombinanti qui la proteina di Gfp. Esso fornisce un approccio di clonaggio semplificato ed ha migliorato 5 l'efficienza per l'espressione di gene bersaglio.

[129] Tramite la presenza del promotore di T7 su pMKSal, l'espressione del gene di *luxR* può anche essere repressa e di conseguenza utilizzata per regolare il macchinario di quorum sensing e la trascrizione del gene bersaglio in condizioni di crescita a densità 10 cellulare elevata.

ESEMPIO 5

Sintesi di proteina di Gfp

[130] Il processo di coltura complessivo per l'espressione di proteina di Gfp ha compreso il seguente. Ceppo di *E. coli* 15 MM294.1/pMKSal-gfp è stato cresciuto in un volume di 50 ml in coltura in *batch* in terreno Ye3X completato con 100 ng/microlitro di Kanamicina, IPTG 1 mM e glucosio 5 g/l, a 25°C, a pH 7,2, con agitazione a 180 rpm. Le cellule (pre-inoculo) sono state cresciute fino ad una densità ottica di 5 a 590 nm. Quindi il pre-inoculo (50 ml) è 20 stato diluito in 5000 ml di terreno Ye3X completato con 100 ng/microlitro di Kanamicina e glicerolo (10 g/l). Le cellule sono state cresciute a 25°C con agitazione a 180 rpm a pH 7,8 in una coltura in *fed-batch* con una alimentazione di glucosio 1 g/l fino a quando è stata raggiunta una densità ottica di 3 a 590 nm. A questa densità ottica, il 25 pH è stato cambiato a 6,2 e l'alimentazione di glucosio è stata arrestata.

La sintesi di Gfp è stata auto-indotta a circa questa densità cellulare, e le cellule sono state cresciute fino a quando è stata raggiunta la fase stazionaria. Le cellule sono state quindi raccolte, e la sintesi di Gfp è stata sagggiata misurando la fluorescenza come descritto 5 precedentemente.

ESEMPIO 6

Amplificazione del sistema di espressione risponde a densità cellulare differente

[131] Per amplificare la risposta del sistema di espressione 10 a densità cellulare differente, è stata costruita una libreria di geni di *luxR* mutanti utilizzando una mutagenesi casuale per reazione a catena della polimerasi propensa ad errore (EP-PCR) come descritto in Cadwell & Joyce (1992). EP-PCR è una PCR in cui la fedeltà della Taq 15 polimerasi viene diminuita senza ridurre significativamente il livello di amplificazione compiuto nella PCR. Questo può essere conseguito modificando la concentrazione di MgCl₂, mediante l'aggiunta di MnCl₂ alla miscela di reazione, e l'utilizzo di concentrazioni non bilanciate dei quattro dNTP.

[132] Tabelle 10 e 11 riassumono le condizioni di reazione 20 utilizzate in questo esempio.

Tabella 10.

| | Stand | Mut 1 | Mut 2 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| pGL506lux | 2 ng | 2 ng | 2 ng |
| Buffer 10x | 10 micl | 10 micl | 10 micl |
| LuxFr | 30 pmoles | 30 pmoles | 30 pmoles |
| LuxRv | 30 pmoles | 30 pmoles | 30 pmoles |
| MgCl2 | 1,5 mM | 7 mM | 7 mM |
| dATP | 0,2 mM | 0,2 mM | 0,2 mM |
| dTTP | 0,2 mM | 1 mM | 1 mM |
| dCTP | 0,2 mM | 1 mM | 1 mM |
| dGTP | 0,2 mM | 1 mM | 0,2 mM |
| MnCl2 | - | 0,5 mM | 0,5 mM |
| Taq pol Platinum | 2,5 U | 5U | 5 U |
| H2O to 100 micl | 64,4 | 23,9 | 31,9 |

Tabella 11.

| | |
|-----------|-----|
| 94°C X 2' | X1 |
| 94°C X30" | X30 |
| 53°C X30" | |
| 72°C X 2' | |
| 72°C X 2' | X1 |
| 4°C | Xo |

[133] EP-PCR è stata utilizzata per amplificare il
5 frammento di operoni di *lux* che ha compreso il gene di *luxR*, il gene di *luxI*, la regione intergenica tra *luxR* e *luxI*, e la regione *luxI-luxC* fino al

codone di avvio del gene di *luxC* (SEQ ID NO:130) con una miscela di primer LuxFr e LuxRv (Tabella 6). Il frammento amplificato è stato clonato nel sito TA del pGLOW-topo (Invitrogen, Tabella 5) in frame con il gene di *gfp*.

5 [134] Tutte le colonie fluorescenti sono state selezionate ed inoculate in terreno fresco contenente antibiotici, e la crescita è stata normalizzata per una notte. L'abilità di queste colonie selezionate di esprimere il gene di *gfp* è stata testata monitorando la fluorescenza in tempo reale in fermentazione di microtitolo. Sono stati ottenuti 10 ottantotto cloni che hanno espresso la *gfp* mediante comportamento di Quorum Sensing. Analisi di sequenza ha mostrato che tutte le mutazioni sono state localizzate nel gene di *luxR*. Caratteristiche dei differenti mutanti vengono riassunte in Tabella 12, in cui le posizioni amminoacidiche sono numerate secondo SEQ ID NO:42. I nucleotidi 15 sono numerati secondo la sequenza codificante per LuxR di tipo selvatico, SEQ ID NO:77.

Tabella 12.

20

25

| <i>Mutante(i)</i> | <i>Tipo di mutazione</i> | <i>Sequenza nucleotidica</i> | <i>Sequenza amminoacidica iniziale</i> | <i>Sequenza amminoacidica risultante</i> | <i>Sequenza di codone</i> |
|--|--------------------------|------------------------------|--|--|--|
| 1M37- 2M27- 2M28 | 1) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala- Cys(19)-Arg- | TGT(Cys- 5,1%) → TGC (Cys- 6,4%) |
| | 2) delezione | del 748 A | LuxR:-Lys- Ser(250)-STOP | -Lys- Val(250)- Lys-Tyr-Val-Ser- Lys-Ala-Stop | AGT (Ser 8,7%)→ GTT (Val 18,3) |
| 1M6 | 1) silente | nt 493 C→T | LuxR:-Ser- Leu(165)- Val- | -Ser- Leu(165)- Val- | CTA (Leu- 3,1%) →TTA (Leu- 10,1%) |
| | 2) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala- Cys(19)-Arg- | TGT (Cys- 5,1%) → TCG (Cys- 6,4%) |
| 1M8-1M9- 1M14- 1M21- 1M24- 1m29- 2M17 | 1) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala-Cys(19)-Arg- | TGT (Cys- 5,1%) → TCG (Cys- 6,4%) |
| 1M16 | 1) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala-Cys(19)-Arg- | TGT (Cys- 5,1%) → TCG (Cys- 6,4%) |
| | 2) missenso | nt 22 G→A | LuxR:-Asp- Asp(8)-Thr- | -Asp-Asn(8)-Thr- | GAC (Asp-37,2%) → AAC (Asn-59,13%) |
| 1M27 | 1) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala-Cys(19)-Arg- | TGT (Cys- 5,1%) → TCG (Cys- 6,4%) |
| | 2) nonsenso | nt 745 A→T | LuxR:-Phe- Lys(249)-Ser- | -Phe-STOP | AAA (Lys 75,44) → TAA (codone di stop) |
| 2M15 | 1) silente | nt 57 T→C | LuxR: -Ala- Cys(19)-Arg- | -Ala-Cys(19)-Arg- | TGT(Cys- 5,1%) → TCG (Cys- 6,4%) |
| | 2) delezione | del 748 A | LuxR:-Lys- Ser(250)-STOP | -Lys- Val(250)- Lys-Tyr-Val-Ser- Lys-Lys-Ala-Lys- | AGT (Ser 8,7%)→ GTT (Val 18,3) |
| | 3) delezione | del 770 T | LuxR:-Lys- Ser(250)-STOP | Gly-Asn-Ser-Thr- Thr-Leu-Asp- STOP | TAA (codone di stop) →AAG (Lys 10.3%) |

[135] Sono stati selezionati cloni con una espressione basale bassa ad una densità cellulare bassa rispetto al controllo MM294.1\pGLlux506 e che hanno avuto una fluorescenza incrementata in condizione indotta (FIG. 9). Lo schema di espressione 5 può essere definito dal momento di induzione, livello massimo di espressione e tutte le sue fasi intermedie con comportamento cinetico caratteristico. I mutanti selezionati costituiscono un pannello di sistemi di espressione con differenze intrinseche in regolazione e forza di espressione.

10 ESEMPIO 7

Riduzione di dosaggio di *luxI* mediante integrazione cromosomica

[136] Integrazione di gene di *luxI* in genoma di *E.coli* MM294.1. La riduzione di dosaggio di gene di *luxI* mediante integrazione 15 cromosomica è stata utilizzata per ottenere un livello di espressione basale basso ed una forte induzione con stretto controllo della espressione di gene. Una copia del gene di *luxI* di tipo selvatico (SEQ ID NO:76) è stata integrata stabilmente nel genoma di *E. coli* MM294.1 mediante ricombinazione omologa utilizzando il plasmide *helper* 20 pKOBEG. Il plasmide pKOBEG è un replicone termosensibile in cui è presente l'operone di redy β a di fago λ espresso sotto il controllo del promotore di pBAD inducibile da arabinosio. pKOBEG viene derivato dal plasmide a numero di copia medio pSC101, conosciuto per essere mantenuto molto stabilmente in ceppi di *E. coli*. Esso conferisce 25 resistenza a cloramfenicolo, così esso può essere trasmesso in ceppi di

E. coli (Chaveroche *et al.*, 2000). Questo sistema promuove fortemente la ricombinazione omologa in *E. coli*. Le sue caratteristiche vengono descritte in Tabella 5. Prodotti di gene di *gam*, *bet* e *exo* di λ codificano per un sistema di ricombinazione omologa efficiente. La proteina di Gam 5 è in grado di inibire l'attività di esonucleasi V di RecBCD che permette la trasformazione di DNA lineare (Unger *et al.*, 1972; Unger and Clark, 1972). I prodotti di gene di *bet* e *exo* sono in grado di promuovere la ricombinazione omologa in regioni di omologia corte tra il prodotto di PCR ed il cromosoma.

10 [137] Il gene di *luxI* di tipo selvatico (SEQ ID NO:76) è stato amplificato da pGLLux506 utilizzando i primer LxIAsclF\LxIAsclR (Tabella 6). Il frammento è stato digerito con enzima di restrizione Ascl ed inserito nel vettore pGLEM al sito di restrizione di Ascl. Questo nuovo vettore è stato chiamato pGLEM-luxI. Questo plasmide contiene 15 il gene di *metE* (Δ *metE*) che è interrotto dal gene per la resistenza ad eritromicina e dal gene di *luxI*. Il frammento Δ *metE*-*erm*-*luxI*- Δ *metE* è stato amplificato dal pGLEM-luxI utilizzando i primer metEL/metER (Tabella 6).

20 [138] Cellule di *E.coli* MM294.1 che contengono il plasmide pKOBEG, sono state rese competenti per l'assorbimento del frammento e per la ricombinazione omologa. Per rendere le cellule competenti, esse sono state cresciute in terreno LB per una notte a 30°C. Quando la densità ottica ha raggiunto 0,2, l'induttore L-arabinosio è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 0,2% per

l'induzione dei geni di *gam*, *bet* ed *exo*. Le cellule sono state cresciute fino a quando la coltura ha raggiunto una densità ottica di 1.

[139] Cellule di *E. coli* MM294.1/pKOBEG competenti sono state trasformate con 1 microgrammo del frammento Δ *metE*-*erm*-*luxI*- Δ *metE*. Dopo trasformazione, 50, 100, o 150 microlitri della coltura sono stati seminati in dischi Petri contenenti LB con eritromicina 100 μ g/ml ed in dischi Petri contenenti LB e kanamicina 40 μ g/ml. Dopo l'incubazione a 37°C per una notte, le colonie sono state cresciute su dischi Petri contenenti LB e cloramfenicolo 20 μ g/ml e quindi su LB ed eritromicina 100 μ g/ml o su LB e kanamicina 40 μ g/ml per una notte a 30°C per essere sicuri che i cloni avessero perso il plasmide *helper*. Allora i cloni sono stati cresciuti a 37°C per svariati passaggi fino a quando essi hanno perso il plasmide *helper* pKOBEG.

[140] I cloni che sono stati resistenti ad eritromicina e sensibili ad ampicillina e cloramfenicolo sono stati testati. La cassetta di *luxI* nel DNA genomico di MM294.1 viene schematizzata nella FIG. 10C. L'integrazione del gene di *luxI* mediante ricombinazione omologa nel locus di *metE* nel genoma di *E. coli* MM294.1 è stata confermata mediante PCR utilizzando i primer LuxI5\LuxI6 e Southern blot (FIG. 10B). Il nuovo ceppo è stato chiamato MM294.1::*luxI*. Per il Southern blot, la sonda è stata etichettata utilizzando il "sistema di etichettatura di acido nucleico e rilevamento ECL di Amersham". La sonda è stata ottenuta mediante PCR utilizzando i primer LuxI5\LuxI6 che hanno amplificato una sequenza nucleotidica di *luxI* di circa 500 basi (FIG. 10A). DNA genomico dai cloni selezionati è stato digerito mediante

enzimi di restrizione *Xma*I e *Aat*II. Il controllo positivo è stato il prodotto della PCR amplificato con LuxI5\LuxI6 ed il DNA di plasmide pGLLux506 dopo digestione mediante enzimi di restrizione *Xma*I e *Aat*II. Il controllo negativo è stato DNA genomico del ceppo di *E. coli* MM294.1.

5 [141] Costruzione di pMKSal- Δ luxI e pMKSal- Δ luxI-gfp e dosaggio dell'auto-induttore. Il gene di *luxI* è stato troncato dopo la digestione del plasmide pMKSal mediante gli enzimi di restrizione *Kpn*I che sono stati inseriti quando è stata utilizzata la sequenza di *luxI*. Essi coprono il 70% della sequenza, ed il gene di *luxI* con il frammento *Kpn*I 10 deleteo non è funzionale. Dopo la digestione, il plasmide lineare è stato auto-circolarizzato ed è stato chiamato pMKSal- Δ luxI (**FIG. 11**).

15 [142] Il gene di *gfp* è stato inserito nel MCS di pMKSal- Δ luxI ed il nuovo vettore è stato chiamato pMKSal- Δ luxI-gfp. Questo plasmide è stato utilizzato per un dosaggio semi-quantitativo dell'auto-induttore in brodo di coltura. Il dosaggio dell'auto-induttore, qui il 3OC6-HSL, è basato sul fatto che MM294.1/pMKSal- Δ luxI-gfp non può produrre una proteina di LuxI funzionale e, di conseguenza, l'auto-induttore. Pertanto, la produzione di proteina di Gfp sarà correlata alla concentrazione di 3OC6HSL presente nel supernatante del campione 20 analizzato.

[143] Ceppi MM294.1/pMKSal- Δ luxI-gfp sono stati cresciuti in YE3X a 25°C, quindi la replicazione è stata bloccata mediante l'aggiunta dell'inibitore trimetroprim. Le cellule sono state risospese in supernatante filtrato della coltura che deve essere testata.

La presenza dell'auto-induttore nel supernatante è stata monitorata mediante la misurazione della fluorescenza.

[144] Nuovo sistema di auto-induzione pMKSaI- Δ luxI nel ceppo di *E. coli* MM294.1::luxI. Il sistema di auto-induzione comprende 5 il gene di luxI, che è stato integrato nel locus di metE in *E. coli* 294.1 mediante ricombinazione omologa; ed il vettore pMKSaI- Δ luxI, dentro il quale può essere clonato il gene di interesse. I vantaggi di questo sistema comprendono una riduzione del dosaggio di gene di luxI ad una copia per cellula; l'espressione minima di LuxI in condizione pre-10 indotta; un accumulo di auto-induttore lento e più controllabile; il raggiungimento della concentrazione critica di auto-induttore ad una densità cellulare più elevata rispetto a come viene ottenuto con un dosaggio di gene elevato di luxI; e l'abilità di controllare indipendentemente il dosaggio di gene di luxI ed il dosaggio di gene del 15 gene di interesse.

[145] Sono stati testati svariati vettori in cellule ospiti differenti (FIG. 12A). L'espressione della proteina di interesse, qui la proteina di Gfp, è stata seguita misurando la fluorescenza (FIG. 12B). Cellule MM294.1 comprendenti il vettore di controllo pMKSaI- Δ luxI-GFP 20 hanno dimostrato un livello basale di fluorescenza. Cellule MM294.1 comprendenti il vettore pMKSaI-GFP hanno prodotto GFP ad una densità cellulare più bassa (OD 0,5-0,7 a 590 nm) rispetto a cellule comprendenti gli altri vettori testati ed hanno espresso livelli più elevati di GFP rispetto a cellule di controllo o cellule che comprendono il vettore 25 pGLLux506. Cellule MM294.1 che comprendono il vettore pGLLux506

esprimono GFP a livelli più bassi rispetto a cellule MM294.1 che comprendono il vettore pMKSaL-GFP; in cellule che comprendono il vettore pGLLux506, l'espressione di GFP è stata indotta ad una densità cellulare con una OD tra 1,5-2,2 a 590 nm e l'induzione è stata 5 graduale.

[146] Cellule ospiti con solamente una copia di *luxI* integrata per cellula (il ceppo MM294.1::*luxI*) e comprendenti il plasmide pMKSaL- Δ *luxI*-GFP vengono indotte per produrre GFP ad una densità cellulare con una OD tra 4,5 a 6 a 590 nm. Il sistema viene attivato più 10 tardi rispetto alle altre combinazioni testate, cosa che è un vantaggio per una produzione su larga scala di proteine ricombinanti.



Dr. Paolo GERLI
N. Iscr. ALBO 814B

RIVENDICAZIONI

1. Proteina di LuxR mutante isolata che ha una sequenza amminoacidica C-terminale estesa rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico.

5 2. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 1 in cui la sequenza amminoacidica C-terminale è estesa di tra circa 5 e circa 20 amminoacidi.

10 3. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 2 in cui la sequenza amminoacidica C-terminale è estesa di 6 amminoacidi o di 15 amminoacidi in lunghezza rispetto alla proteina di LuxR di tipo selvatico.

15 4. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 3 in cui la sequenza amminoacidica C-terminale estesa è VKYVSKA (amminoacidi 250-256 di SEQ ID NO:72) o VKYVSKAKGNSTTLD (amminoacidi 250-264 di SEQ ID NO:75).

5. Proteina di LuxR mutante isolata selezionata dal gruppo consistente in:

20 proteine di LuxR mutanti aventi una sequenza amminoacidica C-terminale troncata ed attività regolatoria migliorata rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico; e

proteine di LuxR mutanti aventi una sequenza amminoacidica C-terminale che è troncata solamente di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 amminoacidi in lunghezza rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico numerata secondo SEQ ID NO:42.

6. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 5 in cui la sequenza amminoacidica C-terminale è troncata di 2 amminoacidi.

7. Proteina di LuxR mutante isolata che comprende 5 un'alterazione amminoacidica in corrispondenza di una o più posizioni amminoacidiche 8-20, in cui le posizioni amminoacidiche sono numerate secondo SEQ ID NO:42.

8. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 7 che comprende un'alterazione amminoacidica in 10 corrispondenza della posizione D8.

9. Proteina di LuxR mutante isolata secondo la rivendicazione 8 che comprende la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:73.

10. Proteina di LuxR mutante isolata secondo una qualsiasi 15 delle rivendicazioni 1-9 che presenta attività regolatoria migliorata rispetto ad una proteina di LuxR di tipo selvatico.

11. Molecola di acido nucleico isolata che codifica per la proteina di LuxR mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

20 12. Molecola di acido nucleico isolata secondo la rivendicazione 11 che comprende una sequenza nucleotidica selezionata dal gruppo consistente in SEQ ID NOS:144-149.

13. Molecola di acido nucleico isolata che comprende una sequenza nucleotidica che codifica per una proteina di LuxI di *V.*

fischeri o una proteina di LuxR di *V. fischeri*, in cui la sequenza nucleotidica è ottimizzata per l'espressione in *E. coli*.

14. Molecola di acido nucleico isolata secondo la rivendicazione 13 in cui la sequenza nucleotidica comprende una
5 sequenza nucleotidica selezionata dal gruppo consistente in SEQ ID NO:78-97, 133, e 134.

15. Vettore di espressione che comprende la molecola di acido nucleico isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14.

16. Vettore di espressione, che comprende:
10 un primo gene operativamente collegato ad un primo promotore, in cui il primo inducibile è indotto da un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore; e

15 un secondo gene operativamente collegato ad un secondo promotore, in cui il secondo promotore non è indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore ed in cui l'espressione del secondo gene interferisce con l'espressione del primo gene.

17. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 16 in cui il primo gene codifica per una proteina tipo LuxR.

18. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 17 in cui
20 la proteina tipo LuxR viene selezionata dal gruppo consistente in LuxR e le proteine di LuxR mutanti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

19. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 16 in cui il primo gene codifica per una proteina di interesse.

20. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 16 che comprende inoltre un terzo promotore operativamente collegato ad un terzo gene codificante per una proteina tipo LuxI.

21. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 20 in cui
5 il terzo gene codifica per LuxI.

22. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 21 che comprende inoltre un quarto promotore operativamente collegato ad un quarto gene codificante per una proteina tipo LuxR.

23. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 22 in cui
10 il quarto gene codifica per LuxR o la proteina di LuxR mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

24. Vettore di espressione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-23 in cui almeno uno tra il primo, il terzo e il quarto gene è ottimizzato per l'espressione in *E. coli*.

15 25. Vettore di espressione, che comprende:

un primo gene codificante per una proteina tipo LuxI operativamente collegato ad un primo promotore;

un secondo gene codificante per una proteina tipo LuxR operativamente collegato ad un secondo promotore;

20 un terzo gene codificante per una proteina di interesse operativamente collegato ad un terzo promotore che è indotto da un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore; e

25 un gene repressore operativamente collegato ad un quarto promotore che è inducibile ma che non è indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore, in cui l'espressione del gene

repressore interferisce con l'espressione di *luxR*.

26. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 25 in cui il primo gene codifica per LuxI.

27. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 25 in cui 5 il secondo gene codifica per LuxR o la proteina di LuxR mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

28. Vettore di espressione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 25-27 in cui almeno uno tra il primo e il secondo gene è ottimizzato per l'espressione in *E. coli*.

10 29. Cellula ospite isolata che comprende un vettore di espressione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-28.

30. Cellula ospite isolata che comprende un gene eterologo selezionato dal gruppo consistente in un primo gene codificante per una proteina tipo LuxI ed un secondo gene codificante per una proteina tipo 15 LuxR, in cui il gene eterologo è stabilmente integrato nel genoma della cellula ospite isolata.

31. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 30 in cui il gene eterologo è il primo gene ed il primo gene codifica per LuxI.

32. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 30 in cui 20 il gene eterologo è il secondo gene ed il secondo gene codifica per LuxR o il LuxR mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

33. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 30 che comprende il primo gene e che comprende inoltre un terzo gene che codifica per una proteina tipo LuxR.

34. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 33 in cui il terzo gene è stabilmente integrato nel genoma della cellula ospite.

35. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 33 in cui il terzo gene codificante per la proteina tipo LuxR è in un vettore di
5 espressione.

36. Cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 33-35 in cui la proteina tipo LuxR viene selezionata dal gruppo consistente in LuxR ed il LuxR mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

10 37. Cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 30-36 che comprende inoltre un vettore di espressione che comprende un gene di interesse operativamente collegato ad un promotore inducibile, in cui il promotore inducibile viene indotto dal complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore.

15 38. Cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 30-37 in cui almeno uno tra il primo, il secondo, e il terzo gene è ottimizzato per l'espressione in *E. coli*.

39. Cellula ospite isolata comprendente:
un gene eterologo che codifica per una proteina tipo LuxR; ed
20 un vettore di espressione che codifica per un gene di interesse operativamente collegato ad un promotore che è indotto da un complesso di proteina tipo LuxR/auto-induttore.

40. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 39 in cui il gene eterologo è presente in un vettore di espressione.

41. Cellula ospite isolata secondo la rivendicazione 39 in cui il gene eterologo è integrato stabilmente nel genoma della cellula ospite.

42. Cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 39-41 in cui il gene eterologo codifica per LuxR o il LuxR 5 mutante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10.

43. Cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 29-42 che è una cellula di *E. coli*.

44. Processo per esprimere un gene di interesse in una cellula ospite, che comprende:

10 coltivare la cellula ospite isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 37, 38, o 39-42 in condizioni che permettono l'espressione del gene di interesse.

45. Processo secondo la rivendicazione 44 che comprende inoltre:

15 preparare un inoculo di una cellula ospite che comprende il vettore di espressione secondo la rivendicazione 16; e

utilizzare l'inoculo per preparare una coltura della cellula ospite.

46. Processo secondo la rivendicazione 44 o 45 che 20 comprende inoltre purificare una proteina ricombinante espressa dal gene di interesse.

47. Processo secondo la rivendicazione 46 che comprende inoltre formulare una composizione farmaceutica comprendente la proteina ricombinante.

48. Processo secondo la rivendicazione 47 in cui la composizione farmaceutica è una composizione di vaccino.

49. Metodo per ottimizzare l'espressione di geni di *luxI* o *luxR* di *V. fischeri*, comprendente:

5 ottenere una sequenza nucleotidica codificante per LuxI o LuxR; e

 modificare la sequenza polinucleotidica per ottimizzare l'uso di codone in *E. coli*.

10 50. Proteina ricombinante ottenuta mediante il processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 44-46.

51. Composizione farmaceutica ottenuta mediante il metodo secondo la rivendicazione 47 o 48.

52. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 51 che è una composizione di vaccino.

15



Dr. Paolo GERLI
N. Iscr. ALBO 814B

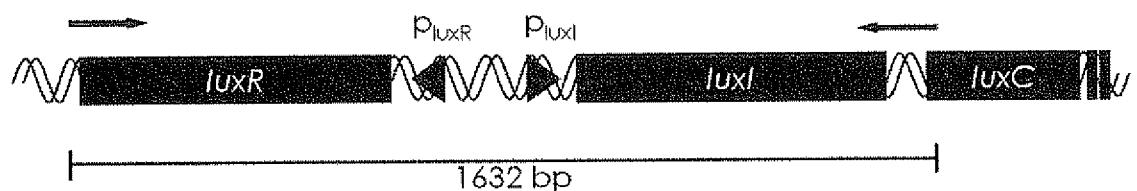


Figure 1: *lux* operon fragment amplified from *V. fischeri* ATCC7744 genomic DNA.

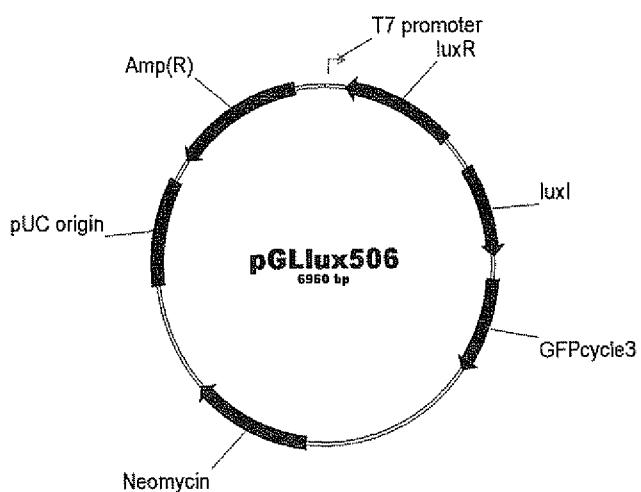


Figure 2: pGLlux506 vector.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

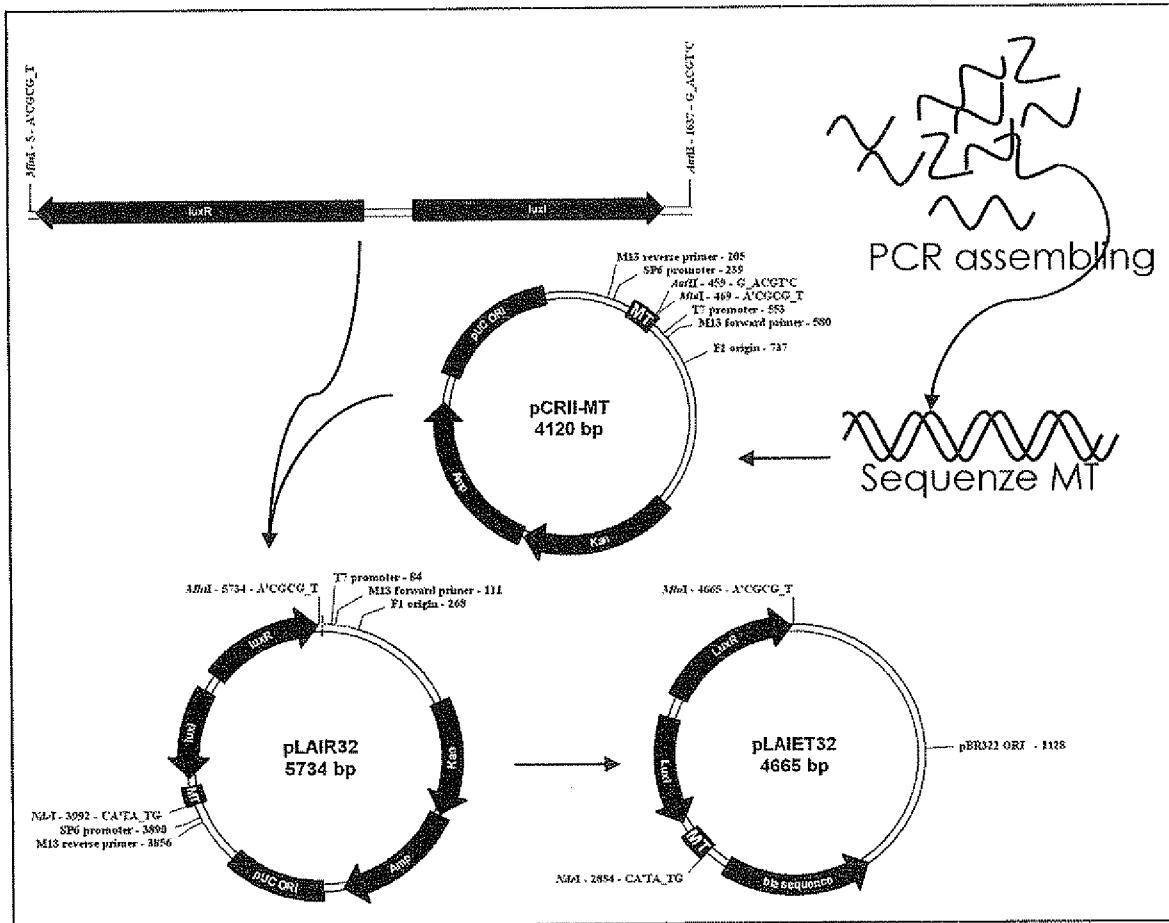


Figure 3: Schema for the construction of pLAIR32 and pLAIET32 vectors


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 525 BM

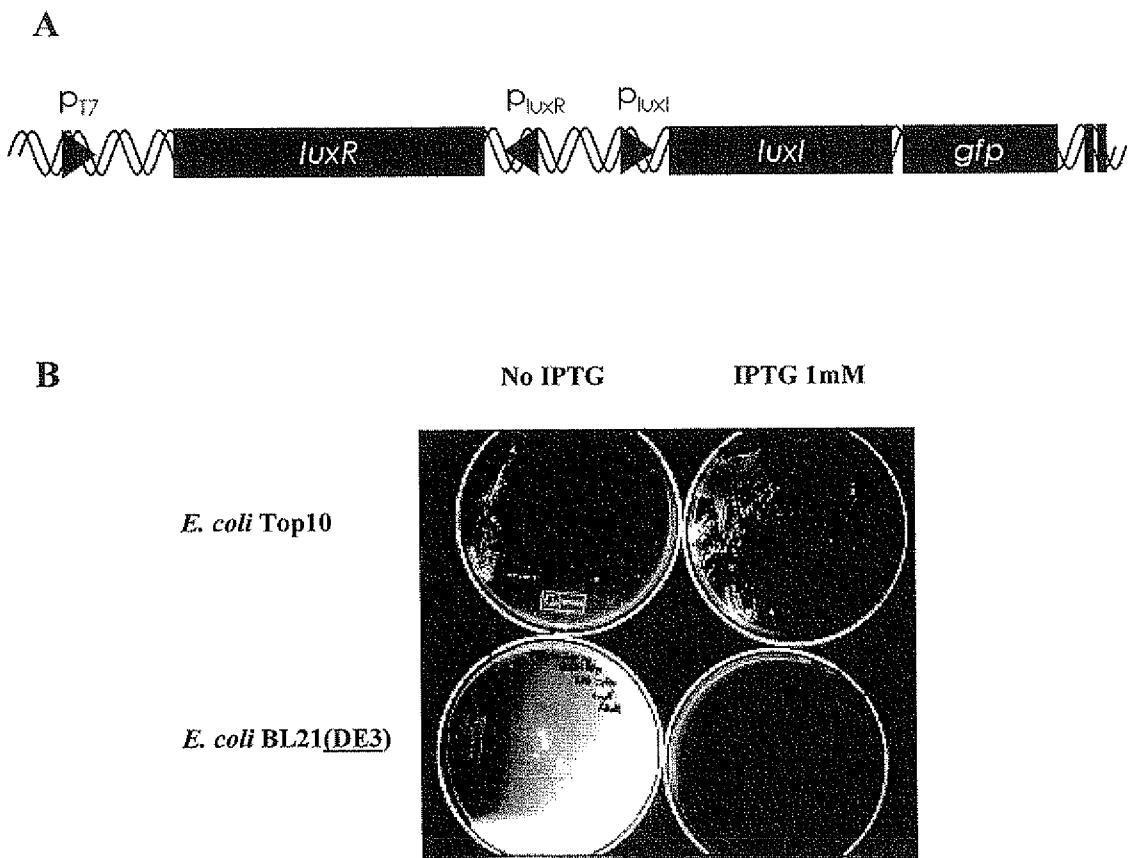
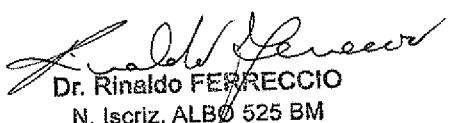


Figure 4: A) Organization of the two convergent promoters P_{T7} and P_{luxR} . **B)** the induction of the T7 promoter in BL21DE3 strain which have been grown on LB agar with 1mM IPTG repressed the *luxR* expression, and so the auto-induction system and consequently the expression of Gfp protein.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

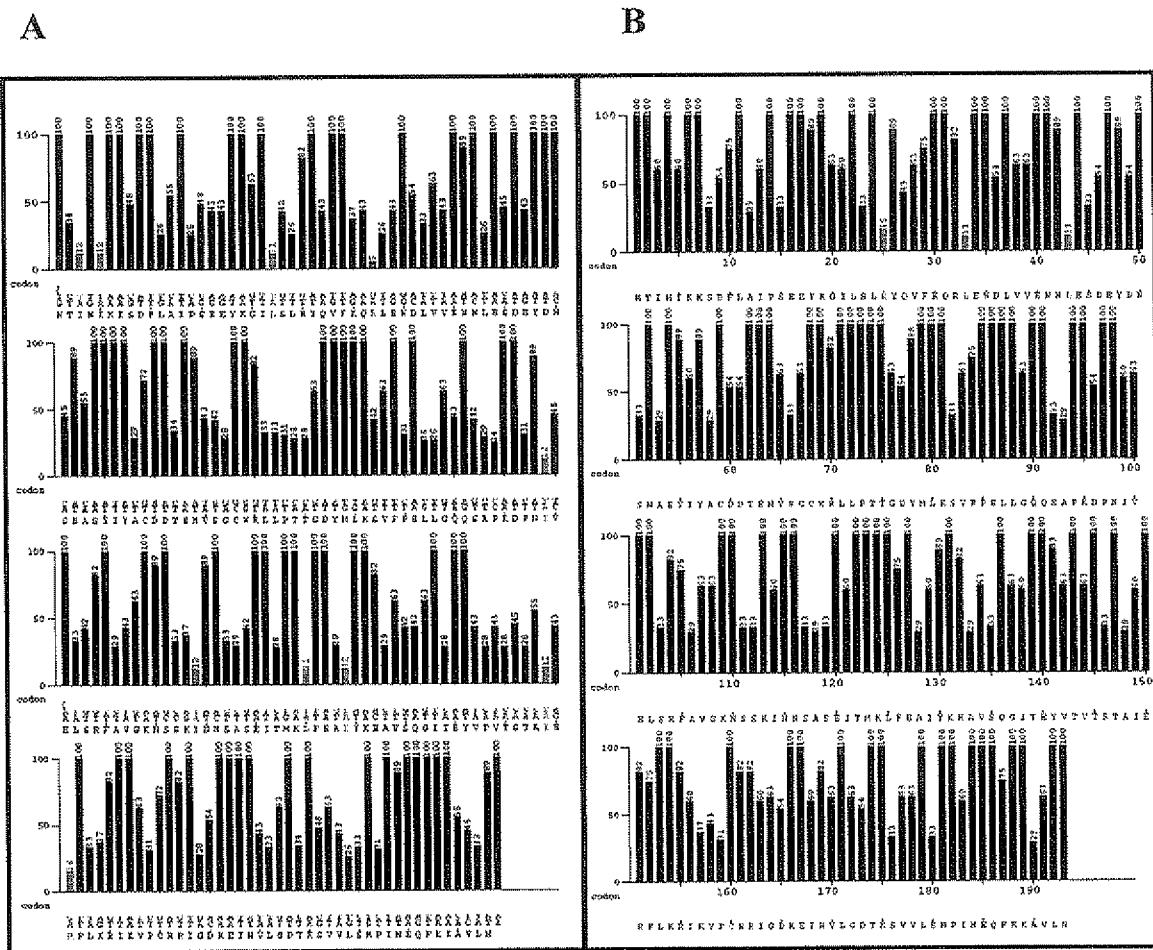


Figure 5: Codon usage optimization in *luxI* gene. **A)** Original sequence, **B)** Optimized sequence.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 - N. Iscriz. ALBO 525 BM

A

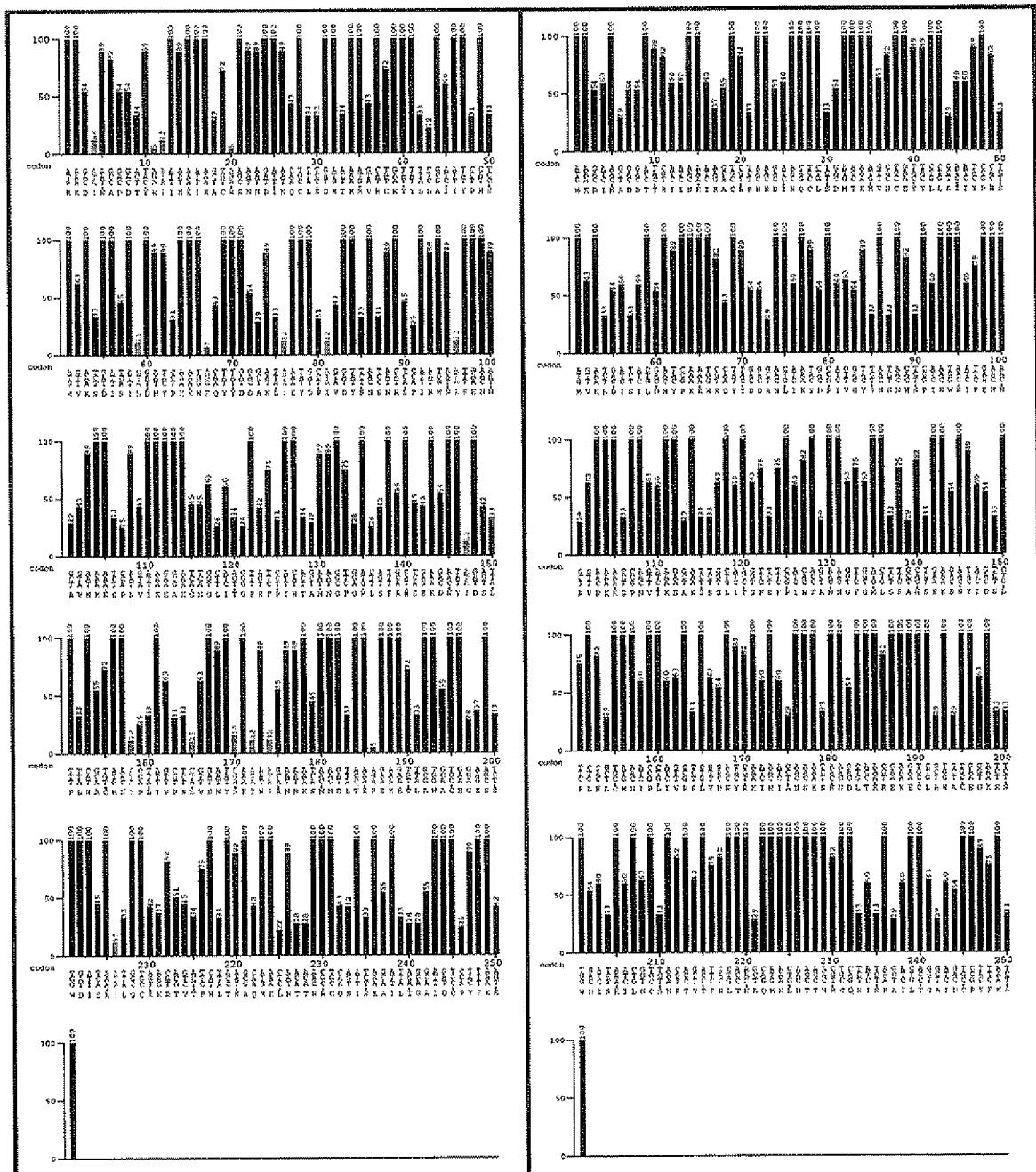
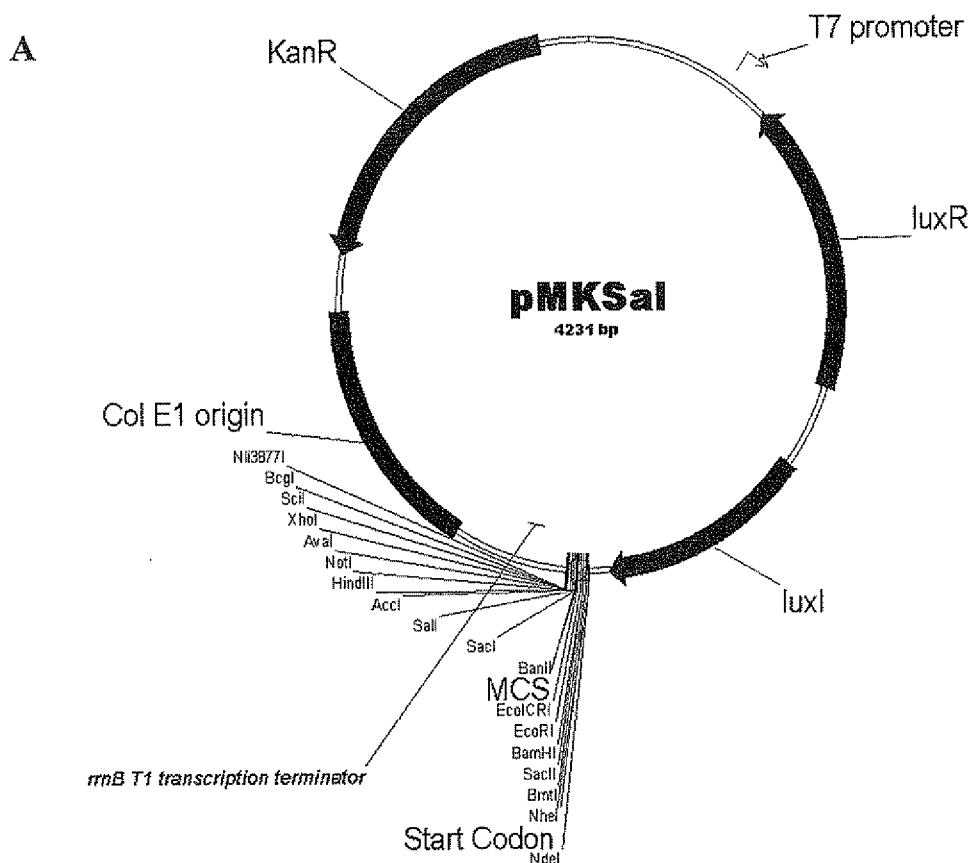


Figure 6: Codon usage optimization in *luxR* gene. A) Original sequence, B) Optimized sequence.

Rinaldo Ferreccio
Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 525 BM



B

Figure 7: pMKSal expression vector. **A)** main features of pMksal vector, **B)** Features of the multiple cloning sites.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 525 BM

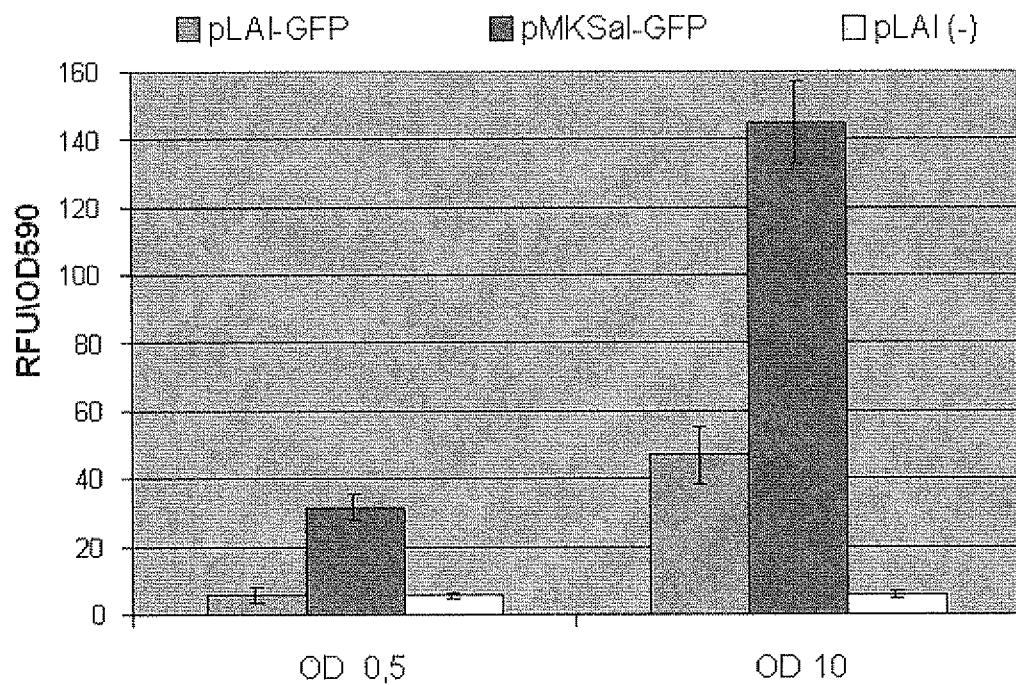


Figure 8: Expression of the *gfp* gene by the pLAI-GFP and pMKSaI-GFP in the auto-induction system. pMKSaI harbored the optimized sequences of *luxR* and *luxI* genes. pLAI(-) is the negative control and do not have the *gfp* gene.


 Dr. Rinaldo FEPRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

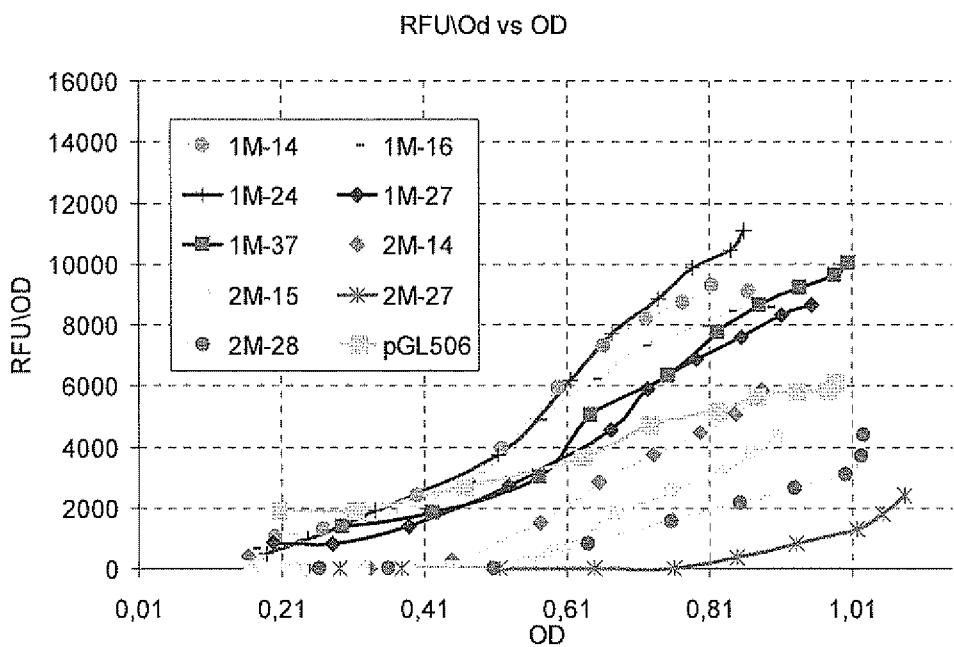
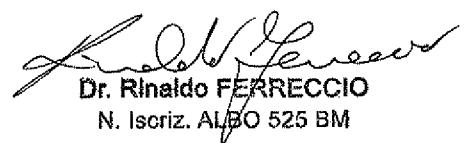


Figure 9: Optimisation of the “lux operon fragment” (*luxR*, *luxI*, cis-acting element in between these two genes) by Error Prone PCR. Example of clones having a fluorescence expression from *gfp* reporter gene with a Quorum sensing behaviour.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

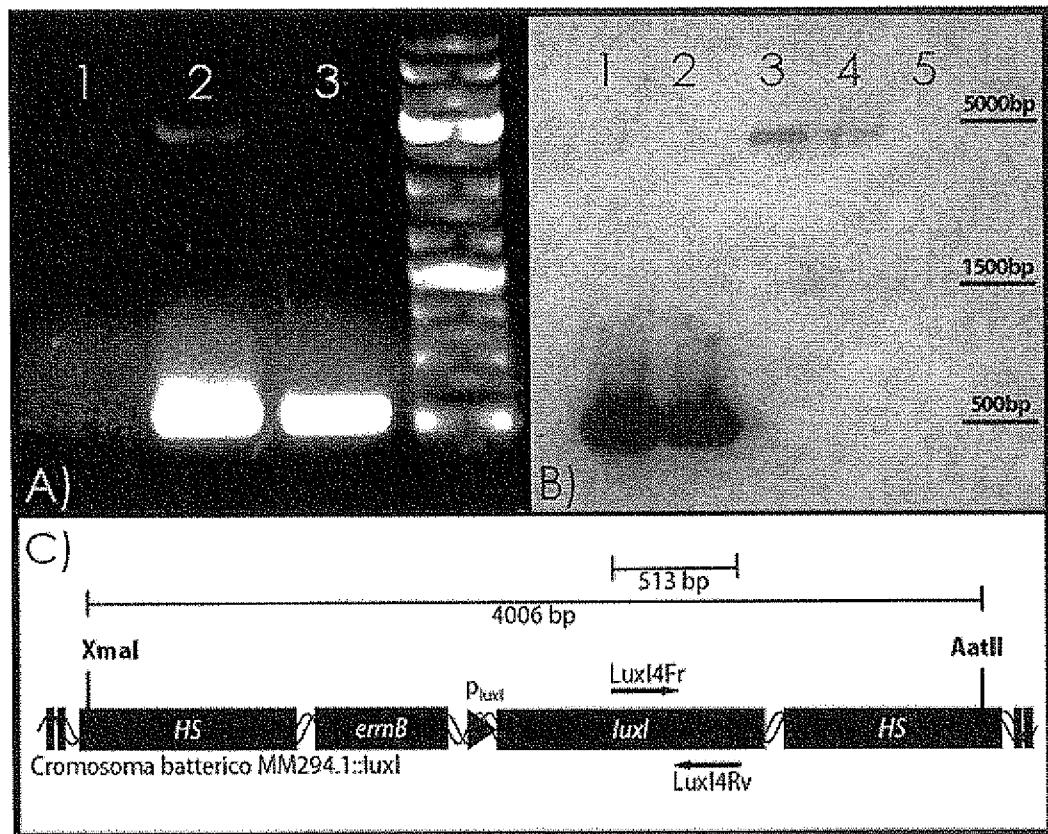
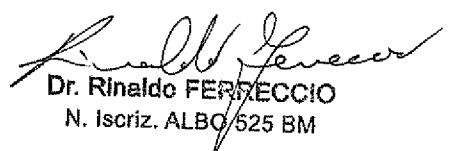


Figure 10: Molecular characterization of MM294.1::luxI strain. **A)** PCR product using the LuxI4Fr\LuxI4Rv primers and MM294.1 genomic DNA as template (Lane 1: negative control, lane 2: positive control pGLLux506 plasmidic DNA, lane 3: MM294.1::luxI genomic DNA). **B)** Southern Blotting using the PCR fragment described in A) as probe, In lanes 1 and 2 PCR product as in A), Lane 3 pGLEM-luxI plasmidic DNA, Lane 4 MM294.1::luxI genomic DNA, Lane 5 MM294.1 genomic DNA. The DNA was digested by XmaI e AatII restriction enzymes. **C)** luxI cassette in MM294.1 genomic DNA.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

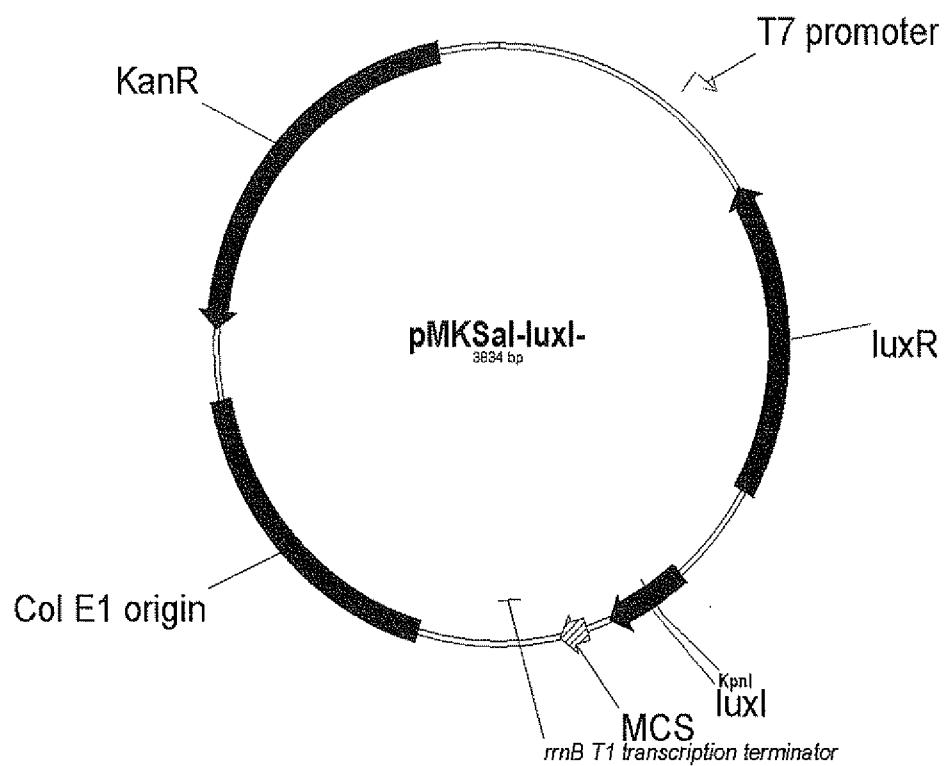
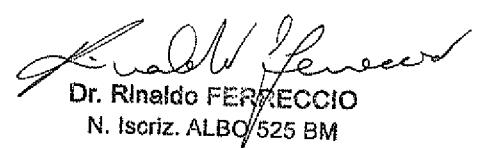


Figure 11 : pMKSal-ΔluxI vector.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 525 BM

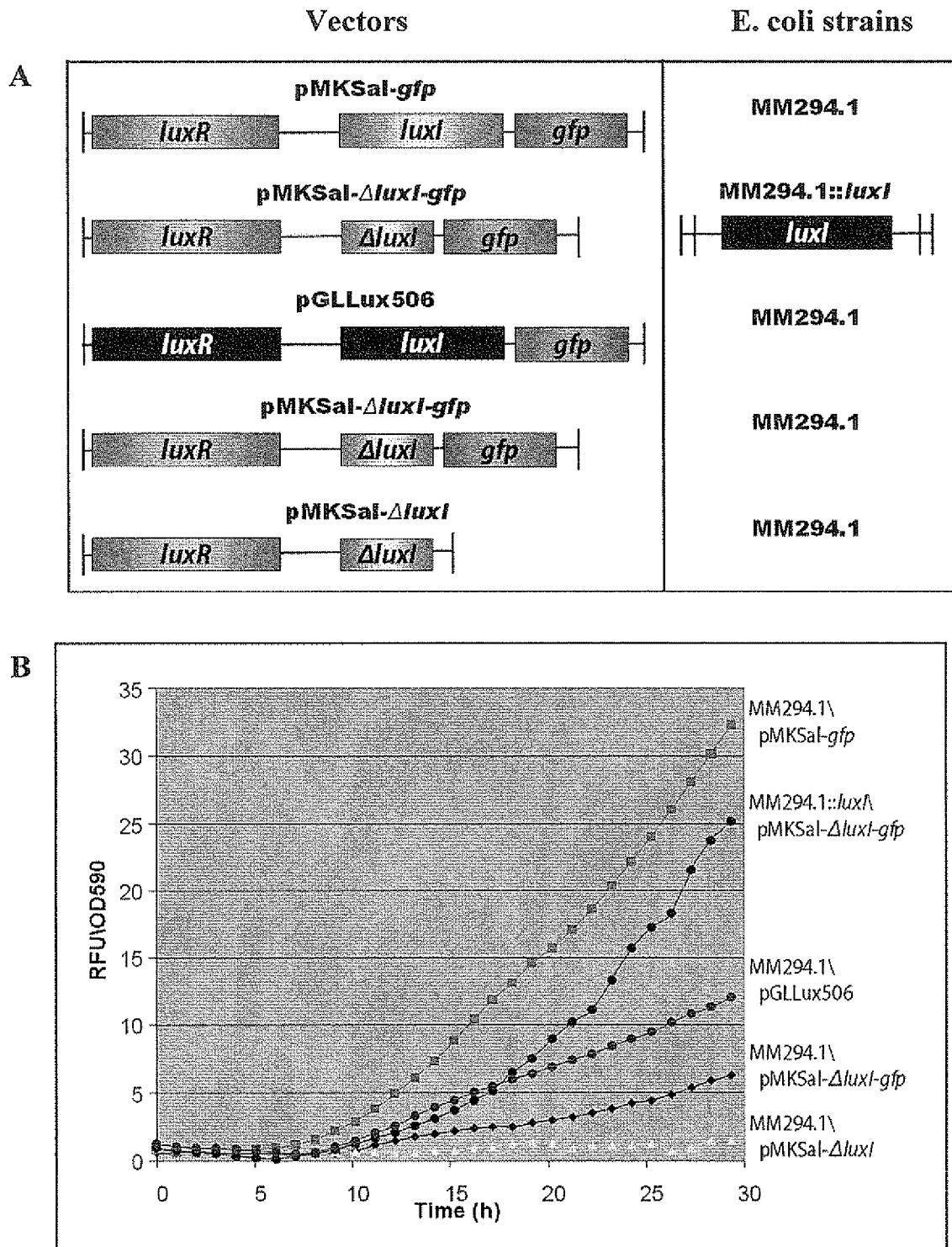
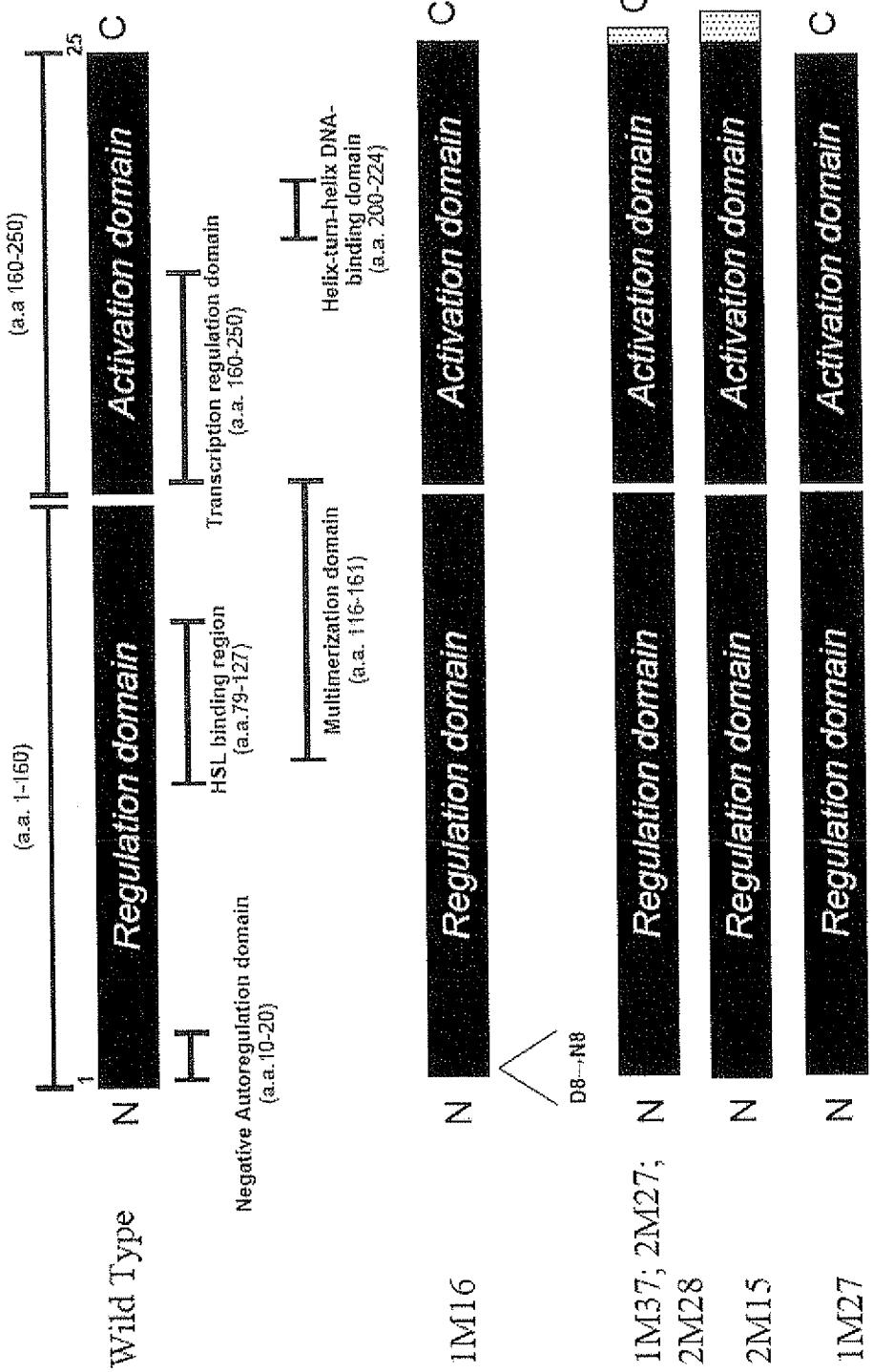


Figure 12: A) different plasmid/host strain combinations to test the expression of Gfp protein, B) Cell culture were normalised by growth in pre-culture until saturation and then diluted in fresh medium. Fluorescence of Gfp protein was measured during the cell growth.


 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 525 BM

FIGURE 13



Rinaldo Ferreccio
 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscriz. ALBO 526 BM.