



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 647**

51 Int. Cl.:
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01978228 .3**
96 Fecha de presentación : **19.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1356073**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Método de fermentación para la producción de productos génicos heterólogos en bacterias de ácido láctico.**

30 Prioridad: **20.10.2000 US 692205**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2010

73 Titular/es: **Bioneer A/S**
Kogle Alle 2
2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es: **Vrang, Astrid;**
Madsen, Soeren, Michael;
Bredmose, Lars;
Ravn, Peter;
Arnau, José;
Johnsen, Mads, Groenvold;
Steenberg, Anne, Cathrine y
Israelsen, Hans

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Método de fermentación para la producción de productos génicos heterólogos en bacterias de ácido láctico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en su aspecto más amplio al campo de la producción de células bacterianas, péptidos, polipéptidos o proteínas recombinantes usando tecnología de ADN recombinante, y en particular al uso de sistemas de expresión génica en una célula hospedante bacteriana de ácido láctico. Específicamente, la invención proporciona un procedimiento de fermentación discontinua alimentada (*fed-batch*) o continua que usa tales sistemas de expresión génica que permiten la producción eficaz en bacterias de ácido láctico de péptidos, polipéptidos o proteínas heterólogos, incluyendo enzimas y productos farmacéuticamente activos.

15 **Técnica anterior y Antecedentes técnicos**

A fin de seleccionar un sistema adecuado para la sobreexpresión de un producto génico deseado, hay que tener en cuenta un número de consideraciones. Aspectos importantes incluyen el rendimiento del producto génico heterólogo requerido, los costes de usar el sistema de expresión, y la autenticidad/actividad biológica del producto génico recombinante producido en el hospedante de producción.

Puesto que la producción a alto nivel de péptidos, polipéptidos o proteínas heterólogos será una carga para la célula hospedante, puede ser ventajoso usar un sistema de expresión génica inducible, es decir, regulable, que se pueda reprimir durante la propagación del organismo de producción, tanto para evitar períodos prolongados de cultivo como para minimizar el riesgo de seleccionar variantes no productivas.

Para desarrollar un sistema de expresión inducible, que sea adecuado para la producción a escala industrial, también es importante que la inducción del sistema no implique dificultades técnicas o el uso de sustancias costosas o tóxicas. Además de la cantidad de producto obtenido a partir del organismo de producción, la pureza del producto génico producido es muy importante. Un rendimiento elevado de producto contenido en un lisado de célula completa se puede reducir sustancialmente durante las etapas subsiguientes del procesamiento aguas abajo requeridas para eliminar componentes indeseados de la célula hospedante. Por lo tanto, generalmente se prefiere la secreción al periplasma en bacterias gramnegativas, o al medio extracelular de bacterias grampositivas.

Hasta ahora *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* han sido los organismos hospedantes bacterianos más ampliamente usados para la producción recombinante de péptidos, polipéptidos y proteínas. La biología molecular de estos organismos está caracterizada hasta un nivel que excede el de todos los otros microorganismos procariotas, y esta intensa investigación ha formado la base para generar una gran colección de herramientas genéticas que han permitido la clonación y expresión fáciles de genes heterólogos en estas bacterias.

Sin embargo, durante la última década se ha puesto atención creciente en el desarrollo de bacterias de ácido láctico (LAB), y en particular *Lactococcus lactis*, como factorías celulares para la producción de péptidos, polipéptidos y proteínas homólogos o heterólogos. Las LAB son ventajosas para la producción de productos génicos heterólogos en varios aspectos. La producción y administración de péptidos, polipéptidos y proteínas recombinantes para aplicaciones farmacéuticas están sometidas a estrictas exigencias a nivel mundial por las autoridades reguladoras. Por ejemplo, las endotoxinas, un componente de la pared celular en la mayoría de las bacterias gramnegativas, deberían de estar ausentes en el producto final. Las bacterias de ácido láctico no producen endotoxinas, lo que las hacen organismos hospedantes atractivos para la producción de proteínas. Además, varias cepas bacterianas de ácido láctico, incluyendo las cepas de *L. lactis*, no producen proteasas extracelulares, y son capaces de segregar péptidos, polipéptidos o proteínas, asegurando una elevada estabilidad del producto génico, facilitando su purificación subsiguiente.

El diseño de un número de sistemas de expresión génica inducibles prometedores, para uso en bacterias de ácido láctico (Kok, 1996; Kuipers *et al.*, 1997; Djordjevic y Klaenhammer, 1998), se ha logrado a través de estudios que se centran en la regulación de la expresión génica en *L. lactis* y sus fagos. Los sistemas de expresión bacteriana de ácido láctico útiles incluyen el sistema NICE (de Ruyter *et al.*, 1996), que se basa en elementos genéticos de un sistema de dos componentes que controla la biosíntesis del péptido antimicrobiano nisina en *L. lactis*. Otros dos sistemas de expresión inducibles útiles se basan en elementos genéticos de los bacteriófagos de *L. lactis* ϕ 31 (O'Sullivan *et al.*, 1996; Walker y Klaenhammer, 1998) y r1t (Nauta *et al.*, 1997).

Se han usado genes informadores sin promotor en transposones, vectores de integración o plásmidos (van der Vossen *et al.*, 1987; Israelsen y Hansen, 1993; Sanders *et al.*, 1998) para identificar promotores inducibles en LAB. Estos promotores se inducen mediante cambios en el medio, tal como el pH (Israelsen *et al.*, 1995) y la concentración de sal (Sanders *et al.*, 1998).

Los sistemas de expresión génica inducidos mediante metabolitos producidos por la célula hospedante o por condiciones de origen natural durante el crecimiento de la célula hospedante son de interés industrial debido al bajo coste y al estado de grado alimentario del factor inductor. Por lo tanto, se han aprovechado promotores inducibles, incluyendo el P170 inducible por pH y sus derivados como se describen en las Solicitudes de Patentes Internacionales Publicadas WO 94/16086 y WO 98/10079, cedidas junto con la presente, en el desarrollo de un nuevo sistema de expresión géni-

co para uso en *L. lactis*. La transcripción desde el promotor P170 es inducida mediante pH bajo durante la transición concomitante a la fase estacionaria, es decir, la expresión es reprimida durante la fase de crecimiento exponencial. En un estudio reciente, el promotor P170 se caracterizó con detalle, y el nivel de expresión original se incrementó aproximadamente 150-200 veces mediante ingeniería genética, sin afectar a la regulación (Madsen *et al.*, 1999).

Aunque los intentos para lograr niveles costosamente eficaces de producto génico usando células hospedantes bacterianas de ácido láctico han sido prometedores, existe sin embargo una necesidad industrial continua de incrementar la productividad de tales sistemas de producción. Adicionalmente, existe la necesidad de proporcionar procesos de fermentación en los que el medio no contenga componentes potencialmente peligrosos que puedan ser un riesgo sanitario para el usuario final de los productos. Los ejemplos de tales componentes indeseados incluyen virus animales y priones, cuya presencia no se puede excluir completamente en medios de fermentación convencionales que contienen componentes de origen animal tales como componentes nitrogenados. Sin embargo, los medios de fermentación actualmente más usados son medios químicamente indefinidos que contienen tales componentes de origen animal.

Por lo tanto, existe una fuerte demanda para proporcionar métodos para producir péptidos, polipéptidos o proteínas heterólogos, métodos los cuales son absolutamente seguros y permiten que se proporcionen los productos génicos deseados a los mismos rendimientos y preferiblemente mayores que los de los métodos de producción actuales.

Los métodos actuales para producir productos génicos heterólogos usando células hospedantes bacterianas de ácido láctico se basan en el cultivo discontinuo de las células hospedantes en medios químicamente indefinidos, ricos en nutrientes. La presente invención engloba el uso de un medio químicamente definido, es decir, sintético, en tales procedimientos de producción. Se encontró que el uso de tales medios en un procedimiento discontinuo convencional dio como resultado un rendimiento de producto génico que fue significativamente menor que el logrado en un medio convencional rico en nutrientes y químicamente indefinido. Sin embargo, se encontró que este problema se podría resolver llevando a cabo el procedimiento de producción como un procedimiento continuo o un procedimiento discontinuo alimentado.

Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona en su aspecto más amplio un método para producir un péptido, polipéptido o proteína heterólogo en una bacteria de ácido láctico, comprendiendo el método las etapas de

- (i) construir una bacteria de ácido láctico recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo, y, enlazadas operablemente a aquella, secuencias nucleotídicas reguladoras apropiadas para controlar la expresión de la secuencia codificante, (ii) cultivar dicha bacteria recombinante en condiciones de cultivo discontinuo alimentado o de cultivo continuo para expresar el gen, y (iii) cosechar la bacteria recombinante, el péptido, polipéptido o proteína.

Las secuencias nucleotídicas reguladoras apropiadas incluyen promotores constitutivos o promotores regulables, es decir, inducibles. En realizaciones en las que se usa un promotor regulable, tal promotor es regulado preferiblemente por un factor medioambiental presente durante el cultivo de la bacteria recombinante, lo que implica que no se requiere añadir sustancias inductoras al medio. Los promotores regulables particularmente útiles incluyen el promotor P170 bacteriano de ácido láctico, regulable por pH, y sus derivados, como se describe en los documentos WO 94/16086 y WO 98/10079.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 336 647 T3

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un medio basal químicamente definido (medio LM1) para cultivar bacterias lácticas en el método anterior, consistiendo el medio en:

Compuesto	Concentración, mM o +/-
L-Alanina	3,4
L-Arginina	1,1
L-Asparagina	0,8
L-Cisteína	0,8
L-Glutamato	2,1
L-Glutamina	0,7
Glicina	2,7
L-Histidina	0,3
L-Isoleucina	0,8
L-Leucina	0,8
L-Lisina-HCl	1,4
L-Metionina	0,7
L-Fenilalanina	1,2
L-Prolina	2,6
L-Serina	2,9
L-Treonina	1,7
L-Triptófano	0,5
L-Tirosina	0,3
L-Valina	0,9
K ₂ SO ₄	0,28 ^a
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	4/6
Acetato de Na	15
CaCl ₂	0,0005 ^a
MgCl ₂	0,52 ^a

Compuesto	Concentración, mM o +/-
FeSO ₄	0,01 ^a
Vitaminas ^b	+
Micronutrientes ^{a, c}	+
Ácido cítrico	0,1
^a De Neidhardt et al. J. Bacteriol. 119 :736-747	
^b Vitaminas: 0,4 µM de biotina, 10 µM de piridoxal-HCl, 2,3 µM de ácido fólico, 2,6 µM de riboflavina, 8 µM de niacinamida, 3 µM de tiamina-HCl y 2 µM de pantotenato	
^c Micronutrientes: 0,003 µM de (NH ₄) ₆ (MO ₇) ₂₄ , 0,4 µM de H ₃ BO ₄ , 0,03 µM de CoCl ₂ , 0,01 µM de CuSO ₄ , 0,08 µM de MnCl ₂ y 0,01 µM de ZnSO ₄ .	

En aún otros aspectos, la invención se refiere a un medio químicamente definido (medio LM3) para cultivar bacterias de ácido láctico que contiene todos los componentes del medio LM1 en cantidades de tres veces, excepto los fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1; y a un medio químicamente definido (medio LM5) para cultivar bacterias de ácido láctico que contiene todos los componentes del medio LM1 en cantidades de cinco veces, excepto los fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1.

Descripción detallada de la invención

Un objetivo primario de la presente invención es proporcionar métodos mejorados para producir bacterias de ácido láctico recombinantes y producir péptidos, polipéptidos o proteínas heterólogos en una bacteria de ácido láctico.

Como se usa aquí, la expresión "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria grampositiva, microaerófila o anaerobia que fermenta azúcares con la producción de ácidos, incluyendo ácido láctico como el ácido producido predominantemente. Las bacterias de ácido láctico industrialmente más útiles se encuentran entre *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.* y *Propionibacterium spp.* Adicionalmente, generalmente se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico las bacterias productoras de ácido láctico que pertenecen al grupo de las bacterias estrictamente anaerobias, las bifidobacterias, es decir, *Bifidobacterium spp.*, que se usan frecuentemente como fermentes alimentarios solos o en combinación con bacterias de ácido láctico.

En una primera etapa del método presente, se construye una bacteria de ácido láctico recombinante para que comprenda una secuencia nucleotídica que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo deseado, y, operablemente enlazadas a ella, secuencias nucleotídicas reguladoras apropiadas para controlar la expresión de la secuencia codificante. Tal construcción se puede obtener usando métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo usando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, 1989.

En realizaciones útiles, la secuencia nucleotídica que codifica un producto génico deseado se selecciona de una secuencia que codifica una enzima, incluyendo una lipasa, una peptidasa, una proteasa, incluyendo una proteasa aspártica que tiene actividad coagulante de la leche, tal como quimosina, pepsina y proteasas aspárticas de origen microbiano, una nucleasa, una enzima implicada en el metabolismo de los hidratos de carbono, incluyendo amilasas y otras enzimas que degradan el almidón, oxidoreductasas, incluyendo como ejemplos glucosa oxidasa y hexosa oxidasa, y una enzima lítica, una secuencia nucleotídica que codifica una proteína vírica tal como una proteína de la cápside, una secuencia que codifica una estructura proteínica de la superficie celular microbiana, y una secuencia que codifica una bacteriocina, tal como, por ejemplo, nisina, reuterina y pediocina. La secuencia nucleotídica puede ser también aquella que codifique un producto génico que confiere resistencia a un antibiótico.

En realizaciones particularmente interesantes, la bacteria de ácido láctico recombinante comprende una secuencia nucleotídica que codifica un producto génico biológicamente funcional, incluyendo una toxina microbiana, un péptido o polipéptido inmunológicamente activo, un péptido, polipéptido o proteína farmacéuticamente activo, y un péptido, polipéptido o proteína antimicrobianamente activo.

En el presente contexto, los productos génicos inmunológicamente activos incluyen cualesquiera secuencias de aminoácidos que comprenden al menos un epítipo. Tales secuencias son útiles como vacunas y/o agentes de diagnóstico, y pueden derivar de cualquier organismo patógeno frente al cual existe la necesidad de inmunizar a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un ser humano. Se entenderá que el epítipo expresado por la secuencia nucleotídica codificante puede ser aquel que se segregue desde la célula al medio de cultivo, o que se puede localizar en la superficie externa del organismo hospedante, con lo cual será posible aplicar la propia célula recombinante como una vacuna. Como alternativa, el epítipo se puede producir intracelularmente, en cuyo caso se aísla de la célula. Otro medio interesante para obtener un epítipo expresado es insertando la secuencia nucleotídica que codifica el epítipo en una secuencia codificante adicional, de forma que el epítipo, en una forma inmunológicamente activa, es expresado como parte de una proteína de fusión.

En una realización específica, la secuencia nucleotídica codificante codifica un determinante o epítipo antigénico micobacteriano, es decir, un oligo- o polipéptido inmunológicamente activo, el cual, cuando se administra a un animal, incluyendo un ser humano, tiene un efecto estimulante sobre la respuesta inmunitaria humoral y/o celular. En particular, tal secuencia codificante puede derivar de un organismo que pertenece al grupo de la especie *Mycobacterium* que se denomina generalmente como el “complejo de la tuberculosis”, que incluye *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. Tales productos génicos antigénicos de origen micobacteriano tienen uso potencial como vacunas contra la tuberculosis y/o como reactivos de diagnóstico en el ensayo de tuberculosis en la piel. Es evidente que la producción industrial de vacunas y agentes activos desde el punto de vista del diagnóstico para uso en seres humanos y animales, en un organismo seguro, no patógeno, como una bacteria de ácido láctico, será muy ventajosa.

En realizaciones útiles adicionales, la secuencia nucleotídica codificante es aquella que codifica un anticuerpo, incluyendo un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. Tal secuencia codificante puede derivar de cualquier fuente animal, incluyendo pájaros, mamíferos y seres humanos.

Según el método de la invención, la célula recombinante puede comprender al menos un promotor constitutivo o al menos un promotor regulable enlazado operablemente a la secuencia nucleotídica codificante, usándose el término “promotor” en el sentido convencional para designar un sitio al que se puede unir la ARN polimerasa.

La región promotora puede derivar, según la invención, de cualquier célula procariota, pero en realizaciones preferidas deriva de una especie bacteriana de ácido láctico, incluyendo las especies anteriores y *Bifidobacterium* spp. En realizaciones útiles, la región promotora deriva de una región promotora de *Lactococcus lactis*, incluyendo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, por ejemplo la cepa denominada MG1363 [esta cepa también se denomina en la bibliografía como *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* (Nauta et al., 1996)], y *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* biovar. *diacetylactis*. En el documento WO 94/16086 se dan ejemplos de tales regiones promotoras que, según la presente invención, son útiles en la construcción de la bacteria de ácido láctico recombinante, incluyendo una región que comprende el promotor P170, y sus derivados, cuyos ejemplos se describen en el documento WO 98/10079.

Como se menciona anteriormente, para ciertos fines puede ser ventajoso que el promotor usado en la bacteria de ácido láctico recombinante sea un promotor regulable o inducible. El factor o factores que regulan o inducen el promotor incluye o incluyen cualquier factor físico y químico que pueda regular la actividad de una secuencia promotora, incluyendo condiciones físicas tales como temperatura y luz, sustancias químicas tales como, por ejemplo, IPTG, triptófano, lactato o nisina. En realizaciones actualmente preferidas, un promotor regulable usado en la invención es regulado mediante un factor medioambiental o de condición de crecimiento que se produce durante la etapa de cultivo. Las ventajas de usar tal promotor regulable es que no hay necesidad de añadir al medio de cultivo compuestos inductores o reguladores. Tal factor regulador se selecciona de pH, la temperatura de crecimiento, el contenido de oxígeno, un desplazamiento de la temperatura que provoca la expresión de genes de choque térmico, la composición del medio de crecimiento, incluyendo la fuerza iónica/contenido de NaCl, la acumulación intracelularmente o en el medio de metabolitos, incluyendo ácido láctico/lactato, la presencia/ausencia de constituyentes celulares esenciales o sus precursores, la fase de crecimiento de la bacteria, o la velocidad de crecimiento de la bacteria.

Se entenderá que cuando el promotor es aquel cuya inducción o regulación está controlada por una o más sustancias presentes en un medio de crecimiento, generalmente no se incluyen como factores medioambientales o de condición de crecimiento, según la invención, sustancias que normalmente no son componentes de tales medios, tales como antibióticos o bacteriocinas.

En una realización preferida, el promotor y el nucleótido que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo se introducen en la bacteria de ácido láctico en un replicón que se replica autónomamente, tal como un plásmido, un elemento transposable, un bacteriófago o un cósmido. Puede ser ventajoso introducir el promotor y la secuencia codificante en condiciones en las que al menos la secuencia codificante se integra en el cromosoma de la célula hospedante, ya que esto proporciona un mantenimiento estable de la secuencia codificante en la célula. Como alternativa, la secuencia codificante heteróloga se introduce en el cromosoma de la célula hospedante en una localización en la que se enlaza operablemente a un promotor que se produce de forma natural en el cromosoma del organismo hospedante seleccionado. De este modo, en una realización adicional, el promotor, que está enlazado operablemente a la secuencia nucleotídica que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo, es un promotor no asociado naturalmente con dicha secuencia codificante.

En una realización ventajosa adicional, la secuencia nucleotídica codificante está enlazada operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica un péptido señal (SP) que permite que el producto génico sea segregado a lo largo de la membrana celular y en el medio. Los SP son las extensiones N-terminales presentes en proteína segregadas dependientes de Sec. La estructura de un SP típico incluye tres regiones distintas: (i) una región N-terminal que contiene un número de aminoácidos cargados positivamente, lisina y arginina; (ii) un núcleo hidrófobo central; y (iii) un término C hidrófilo que contiene el motivo de secuencia reconocido por la peptidasa señal. Las proteínas que son seleccionadas como dianas para ser segregadas incluyen una secuencia señal o péptido señal (SP) en el término N. Los SP son reconocidos y escindidos mediante una peptidasa líder o señal, un componente de la maquinaria de secreción de la célula, durante la translocación a través de la membrana celular. Los SP tienen normalmente un tamaño de 25 a alrededor de 35 aminoácidos (aa) en bacterias grampositivas. Los SP no comparten homología de secuencias, pero a menudo están compuestos de un término amino que incluye uno o más aa básicos, un núcleo central hidrófobo de siete o más aa, y un término carboxi hidrófilo que contiene el motivo que es reconocido por peptidasas señales. Un estudio de los SP disponibles de *L. lactis* sugirió el uso del SP procedente de Usp45, la principal proteína lactocócica segregada (van Asseldonk *et al.*, 1990). Se informó que este SP es funcional en la secreción de varias proteínas heterólogas en *L. lactis* (van Asseldonk *et al.*, 1993).

En una realización específica, el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en el péptido señal Usp45 y el péptido señal que tiene la secuencia MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSQDAQAERS (SEQ ID NO: 1).

En una etapa subsiguiente del método según la invención, la bacteria de ácido láctico recombinante así obtenida se cultiva en condiciones de cultivo discontinuo alimentado o de cultivo continuo para expresar la secuencia que codifica el producto génico deseado, y las células recombinantes o el péptido, polipéptido o proteína se cosechan, bien durante el cultivo (en continuo) o cuando se termina la etapa de cultivo (discontinuo alimentado), usando técnicas convencionales para separar células, péptidos, polipéptidos y proteínas.

En el sentido más amplio, la expresión “cultivo discontinuo alimentado” se define como una técnica de cultivo en la que se suministra uno o más nutrientes durante el cultivo al recipiente de cultivo o biorreactor, y en la que las células cultivadas y el producto génico permanecen en el recipiente hasta el final del experimento. En algunos casos, todos los nutrientes se alimentan gradualmente al biorreactor. Como se usa aquí, la expresión “cultivo continuo” se usa para describir un procedimiento de cultivo en el que todos los nutrientes se añaden continuamente al recipiente de cultivo o biorreactor, y las fracciones del medio y/o cultivo celular se eliminan al mismo caudal que aquel de los nutrientes suministrados, para mantener un volumen constante de cultivo.

En contraste con estos métodos de cultivo de la invención, un cultivo “discontinuo” convencional es un procedimiento en el que todos los nutrientes requeridos durante un experimento de cultivo, excepto el oxígeno molecular en un procedimiento aerobio y los productos químicos para el ajuste del pH, se añaden al medio antes de que comience el cultivo.

Las condiciones de tiempo-temperatura, las condiciones de pH y las condiciones de aereación, si son pertinentes, y la velocidad de alimentación de los nutrientes al biorreactor dependerán, entre otros, del tipo particular de bacteria de ácido láctico que se use. En los siguientes ejemplos se proporcionan ejemplos específicos de tales condiciones. Típicamente, un cultivo discontinuo alimentado, en las condiciones anteriores, se lleva a cabo durante 24-72 horas a una temperatura en el intervalo de 15-40°C y a un pH en el intervalo de 4-8. Un procedimiento de cultivo continuo según la invención puede funcionar, en estas condiciones de temperatura y pH, durante períodos más prolongados de tiempo, tales como varios cientos de horas.

En realizaciones actualmente preferidas del método, la bacteria de ácido láctico recombinante se cultiva en un medio químicamente definido. Como se usa aquí, la expresión “medio químicamente definido” significa un medio que no contiene esencialmente fuentes indefinidas de nitrógeno o carbono tales como proteína animal o vegetal o composiciones de hidrolizados de proteínas, o fuentes de carbono complejas tales como, por ejemplo, melazas o licor de maíz fermentado, sino en el que las fuentes nitrogenadas son compuestos inorgánicos u orgánicos bien definidos tales como amoníaco o aminoácidos, y la fuente de carbono es un azúcar bien definido, tal como glucosa. Adicionalmente, tal medio sintético contiene componentes minerales tales como sales, por ejemplo sulfatos, acetatos, fosfatos y cloruros de metales alcalinos y alcalino-térreos, vitaminas y micronutrientes. Los ejemplos de medios químicamente definidos para los fines de la presente invención se dan aquí. Se apreciará que estos medios son sólo ejemplos. La persona experta en la técnica será capaz de proporcionar otros medios que permitan el cultivo de bacterias de ácido láctico recombinantes en las condiciones de cultivo anteriores.

El medio sintético usado en el presente método debe de contener una fuente de carbono. La concentración de fuente de carbono depende del tipo de bacteria de ácido láctico recombinante y de las condiciones de cultivo seleccionadas. En realizaciones útiles, la fuente de carbono es glucosa. En realizaciones preferidas, la concentración de glucosa en el cultivo se mantiene a una concentración seleccionada previamente de al menos alrededor de 0,5 g/l alimentando de forma controlada glucosa en un procedimiento discontinuo alimentado, o alimentando el medio completo que contiene glucosa en un procedimiento de cultivo continuo. La concentración de glucosa en el medio de cultivo puede ser preferiblemente al menos 5 g/l, tal como al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 ó 100 g/l.

Según la invención, una manera conveniente de controlar la alimentación de glucosa al medio en un procedimiento discontinuo alimentado es enlazar o conectar tal alimentación al medio de control de pH del biorreactor. De esta

ES 2 336 647 T3

manera, la alimentación de glucosa es activada por el medio que controla la adición automática de base para controlar el pH. De forma similar, en un procedimiento de cultivo continuo, la alimentación del medio completo se puede enlazar al control de pH según el principio de un pH-auxostato.

5 Aunque se encontró que se podrían obtener rendimientos satisfactorios de producto génico usando un medio puramente sintético, se encontró que el rendimiento se puede incrementar adicionalmente suplementando un medio químicamente definido como se define anteriormente con extracto de levadura. Una cantidad adecuada de extracto de levadura es una cantidad en el intervalo de 0,1-10 g/l, tal como, por ejemplo, en el intervalo de 1-5 g/l. En consecuencia, en el presente contexto, un "medio químicamente definido" puede incluir un medio químicamente definido
10 enriquecido con una cantidad apropiada de extracto de levadura.

El principal objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir un producto génico con un rendimiento elevado. En consecuencia, en realizaciones preferidas, el rendimiento de péptido, polipéptido o proteína es al menos 5 mg/l, más preferiblemente al menos 10 mg/l, tal como al menos 20 mg/l, incluyendo al menos 50 mg/l.
15 En realizaciones particularmente preferidas, el rendimiento que se obtiene es al menos 100 mg/l, incluyendo al menos 150 mg/l, y al menos 200 mg/l.

Como se menciona anteriormente, la invención se refiere en un aspecto adicional al uso de un medio basal químicamente definido específico (medio LM1) para cultivar bacterias en el método de la invención, consistiendo el
20 medio en:

Compuesto	Concentración, mM o +/-
25 L-Alanina	3,4
L-Arginina	1,1
L-Asparagina	0,8
30 L-Cisteína	0,8
L-Glutamato	2,1
35 L-Glutamina	0,7
Glicina	2,7
L-Histidina	0,3
40 L-Isoleucina	0,8
L-Leucina	0,8
L-Lisina-HCl	1,4
45 L-Metionina	0,7
L-Fenilalanina	1,2
L-Prolina	2,6
50 L-Serina	2,9
L-Treonina	1,7
55 L-Triptófano	0,5
L-Tirosina	0,3
L-Valina	0,9
60 K ₂ SO ₄	0,28 ^a
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	4/6
Acetato de Na	15
65 CaCl ₂	0,0005 ^a

ES 2 336 647 T3

Compuesto	Concentración, mM o +/-
MgCl ₂	0,52 ^a
FeSO ₄	0,01 ^a
Vitaminas ^b	+
Micronutrientes ^{a,c}	+
Ácido cítrico	0,1
^a De Neidhardt et al. J. Bacteriol. 119:736-747	
^b Vitaminas: 0,4 μM de biotina, 10 μM de piridoxal-HCl, 2,3 μM de ácido fólico, 2,6 μM de riboflavina, 8 μM de niacinamida, 3 μM de tiamina-HCl y 2 μM de pantotenato	
^c Micronutrientes: 0,003 μM de (NH ₄) ₆ (MO ₇) ₂₄ , 0,4 μM de H ₃ BO ₄ , 0,03 μM de CoCl ₂ , 0,01 μM de CuSO ₄ , 0,08 μM de MnCl ₂ y 0,01 μM de ZnSO ₄ .	

También se proporcionan medios químicamente definidos derivados del medio LM1, incluyendo el medio LM3 que contiene todos los componentes del medio LM1 en cantidades de tres veces, excepto fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1, y el medio denominado como el medio LM5, que contiene todos los componentes del medio LM1 en cantidades de cinco veces, excepto fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1.

Como también se señala anteriormente, el medio químicamente definido usado en la invención se debe de suplementar con una fuente adecuada definida de carbono. En consecuencia, en realizaciones útiles, cualquiera de los medios anteriores se suplementa con glucosa, típicamente en una cantidad en el intervalo de 1-100 g/l, incluyendo el intervalo de 2-50 g/l, tal como en el intervalo de 5-40 g/l.

La invención se describirá ahora con mayor detalle en los siguientes ejemplos y los dibujos, en los que:

La Fig. 1 es una presentación esquemática de plásmidos que expresan SNasa usados aquí. El rendimiento de SNasa segregada (unidades/ml) obtenida en medio GM17 en cultivos en matraces o fermentadores se indica a la derecha,

la Fig. 2 es una presentación de valores de OD₆₀₀ máximos obtenidos a partir de experimentos de fermentación en medios definidos con diferentes concentraciones de glucosa y valores de pH: 5,5, cuadrados; 6,0, triángulos; 6,5, círculos; y 7,0, diamantes,

la Fig. 3A-D muestra la cinética de crecimiento (OD₆₀₀, diamantes) y la producción de SNasa (unidades/ml, cuadrados) mediante la cepa SMBI111 de *L. lactis* (plásmido de número medio de copias, SP310mut2) en medio LM3-30 tras la fermentación a diferentes valores de pH. (A) pH 5,5; (B) pH 6,0; (C) pH 6,5; (D) pH 7,0,

la Fig. 4A-B ilustra la actividad de SNasa frente a OD₆₀₀ para SMBI111 durante el crecimiento en medio LM3-15 (A) y durante el crecimiento en medio LM3-30 (B) a pH 5,5 (cuadrados), 6,0 (triángulos), 6,5 (círculos), y 7,0 (diamantes),

la Fig. 5 muestra el análisis de SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo procedentes de *L. lactis* SMBI111 tras la fermentación en medio LM3-30 a pH 6,5. Las líneas 1-9 corresponden a las muestras de cultivo que se analizaron para determinar la actividad de nucleasa en la Fig. 3C. Se cargaron en cada línea diez μl de sobrenadante de cultivo bruto. Las masas moleculares (en kilodaltons) se indican a la derecha. El triángulo indica la posición de la SNasa segregada,

la Fig. 6A-C muestra la inducción de P170 mediante adición de lactato de potasio. Se hizo crecer SMBI111 en medio LM3-30 a pH 7,0. En el tiempo indicado por flechas, cuando la OD₆₀₀ fue aproximadamente 0,7, se añadió agua (6A), lactato de potasio 200 mM (6B), o cloruro de potasio 200 mM (6C) al cultivo. La OD₆₀₀ se muestra como triángulos, y la actividad de nucleasa (unidades/ml) como cuadrados,

la Fig. 7A-D ilustra la cinética de la producción de SNasa mediante SMBI111 durante fermentaciones discontinuas alimentadas en medio LM5-5 a diferentes valores de pH: (A) pH 5,5, (B) pH 6,0, (C) pH 6,5. En 7A-7C, la OD₆₀₀ se muestra como triángulos, y la actividad de nucleasa (unidades/ml) como cuadrados. 7D muestra la actividad de SNasa frente a OD₆₀₀ a los diferentes valores de pH: 5,5, cuadrados; 6,0, triángulos; y 6,5, círculos. Las líneas punteadas indican que se produce dispersión en los valores elevados de OD₆₀₀. En consecuencia, en el panel D se omitieron algunos valores de OD₆₀₀ que intervienen,

la Fig. 8 muestra el rendimiento final de SNasa obtenida a partir de SMBI111 mediante fermentación en medios definidos con diferente concentración de glucosa: 5 g/l en LM1-5 con 50 mM de NaCl; 15 g/l en LM3-15; 30 g/l en LM3-30; y ≥ 70 g/l añadidos gradualmente a LM5-5 durante el cultivo discontinuo alimentado, y a diferentes valores de pH: 7,0, barras en blanco; 6,5, barras con puntos; 6,0, barras rayadas; y 5,5, barras en negro,

la Fig. 9A-B ilustra la fermentación discontinua alimentada de la cepa SMBI104 (plásmido de copia elevada, SP310mut2) en medio LM5-5 a pH 6,5. (A) Cinética de crecimiento (OD₆₀₀, triángulos) y producción de SNasa (unidades/ml, cuadrados). (B) Análisis de SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo procedentes de SMBI104 tras la fermentación discontinua alimentada. Las líneas 1-9 corresponden a las muestras de cultivo que se analizaron para determinar la actividad de nucleasa en la Fig. 9A. Se cargaron 10 μ l de sobrenadante de cultivo bruto en cada línea. Las masas moleculares (en kilodaltons) se indican a la derecha. El triángulo indica la posición de la SNasa segregada,

la Fig. 10 ilustra el cultivo en medio LM5-50 de AMJ627 a pH 6,5 en un pHauxostato, en el que se añadieron simultáneamente al fermentador hidróxido de potasio y medio en respuesta a la unidad de control del pH. Durante el experimento, la relación entre las cantidades de base y medio añadidos al fermentador se ajustó a diferentes valores. Las barras indican la capacidad tamponante de entrada que resulta de las diferentes relaciones, calculada como número de moles de hidróxido por litro de volumen total añadido (base más medio). La concentración de lactato en el cultivo se muestra como triángulos, y la velocidad de dilución se muestra como cuadrados. OD₆₀₀ y la actividad de SNasa (unidades/ml) se indican como diamantes y círculos, respectivamente,

la Fig. 11 muestra OD₆₀₀ (símbolos oscuros) y la actividad de SNasa (símbolos en blanco) durante el cultivo en quimiostato a corto plazo de SMBI111 a dos velocidades diferentes de adición de medio (triángulos: 0,14 l/h, y círculos: 0,07 l/h), en comparación con un cultivo discontinuo comenzado en paralelo (cuadrados). En todos los casos se usó medio LM5-50, pH 6,5, y

la Fig. 12 muestra OD₆₀₀ (diamantes oscuros) y la actividad de SNasa (diamantes blancos) durante el cultivo de SMBI111 en medio LM5-50 a pH 6,5 con adición continua de medio reciente y eliminación del filtrado, mientras que las células se reciclaron a la vasija de cultivo. Para comparación, se muestran (cuadrados) los resultados de un cultivo discontinuo comenzado en paralelo.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

En la Tabla 1 se enumeran las cepas y plásmidos usados en este estudio.

Se hizo crecer la cepa DH10B de *E. coli* (Grant *et al.*, 1990) a 37°C en medio LB suplementado con 200 μ g/ml de eritromicina cuando fue apropiado. Se hizo crecer de manera normal la cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* (Gasson, 1983) a 30°C en medio GM17 (1,5 x M17 con 5 g/l de glucosa) suplementado, cuando se necesitase, con 1 μ g/ml de eritromicina. Todos los experimentos en matraces y en el fermentador se llevaron a cabo a 30°C.

Para evitar la inducción del promotor P170, se hicieron crecer precultivos en el medio ArgM17 (Madsen *et al.*, 1999), y se cosecharon a una OD₆₀₀ de 0,5 a 1,0. Las células se lavaron y se concentraron 20 veces en tampón de fosfato de potasio 20 mM frío, pH 6,8. Alícuotas de 1 ml de la suspensión se congelaron con glicerol (35% de concentración final) a -70°C para ser usadas para la inoculación de 1 litro de medio fermentador.

Tabla 1

Bacterias y plásmi- dos	Características relevantes	Referencia o fuente
<u>Bacterias</u>		
<i>L. lactis</i>		
MG1363	Hospedante para la expresión/secreción de la nucleasa	Gasson, 1983
<i>E. coli</i>		
DH10B	Hospedante clonante de <i>E. coli</i>	Grant et al. 1990
<u>Plásmidos</u>		
pHBA102	Plásmido que contiene el terminador transcripcional de <i>E. coli</i> rrnCtt'	Albrechtsen et al., 1990
pTRKH4	Vector de clonación de <i>E. coli</i> -Lactococcus, número elevado de copias en <i>L. lactis</i>	O'Sullivan y Klaenhammer, 1993
pBS::Nuc	Plásmido que contiene el gen de la nucleasa de <i>S. aureus</i>	Le Loir et al., 1994
pASPNuc	Vector sonda de péptido señal que contiene el promotor P170 procedente de pAMJ586	Ravn et al. 2000
pAMJ586	Promotor P170 regulado en pAK80	Madsen et al., 1999
pAMJ752	Variante del promotor P170 regulado potente en pAK80	Madsen et al., 1999

pNZ1020	Plásmido que contiene la secuencia del péptido señal Usp45	van Asseldonk et al., 1990
P310MUT2	Plásmido que contiene secuencia del péptido señal SP310mut2	Ravn et al., datos no publicados
pSMA610	Vector de expresión/secreción de número medio de copias (MC), promotor procedente de pAMJ586, péptido señal Usp45	Este estudio
pSMA219	pSMA610 que contiene el terminator transcripcional rrnCtt'	Este estudio
pAMJ325	Vector de expresión de número elevado de copias (HC), promotor procedente de pAMJ752	Este estudio
pAMJ328	pAMJ325 que contiene el terminator transcripcional rrnCtt'	Este estudio
pAMJ166	pAMJ610 que contiene el gen de la nucleasa de S. aureus	Este estudio
pSMBI91	Vector HC que expresa la nucleasa; promotor P170 potente, péptido señal SP310mut2	Este estudio
pSMBI93	Vector MC que expresa la nucleasa; promotor P170 potente, péptido señal UspP45	Este estudio
pSMBI98	HC vector que expresa la nucleasa; promotor P170 potente, péptido señal UspP45	Este estudio
pSMBI109	Vector MC que expresa la nucleasa; promotor P170 potente, péptido señal SP310mut2	Este estudio

ES 2 336 647 T3

El medio definido basal usado para la fermentación, LM1, derivó del medio SA desarrollado por Jensen y Hammer (1993). Este último medio tuvo la siguiente composición (mM o presencia/ausencia en medio):

Compuesto	Concentración, mM o +/-
L-Alanina	3,4
L-Arginina	1,1
L-Asparagina	0,8
L-Cisteína	0,8
L-Glutamato	2,1
L-Glutamina	0,7
Glicina	2,7
L-Histidina	0,3
L-Isoleucina	0,8
L-Leucina	0,8
L-Lisina-HCl	1,4
L-Metionina	0,7
L-Fenilalanina	1,2
L-Prolina	2,6
L-Serina	2,9
L-Treonina	1,7
L-Triptófano	0,5
L-Tirosina	0,3
L-Valina	0,9
NH ₄ Cl	9,5 ^a
K ₂ SO ₄	0,28 ^a
KH ₂ PO ₄	1,3 ^a
Acetato de Na	15
Glucosa	50
MOPS	40 ^a

ES 2 336 647 T3

Compuesto	Concentración, mM o +/-
Tricina	4 ^a
CaCl ₂	0,0005 ^a
MgCl ₂	0,52 ^a
FeSO ₄	0,01 ^a
NaCl	50 ^a
Vitamina ^b	+
Micronutrientes ^{a,c}	+
^a De Neidhardt et al. J. Bacteriol. 119 :736-747	
^b Vitaminas: 0,4 µM de biotina, 10 µM de piridoxal-HCl, 2,3 µM de ácido fólico, 2,6 µM de riboflavina, 8 µM de niacina-mida, 3 µM de tiamina-HCl y 2 µM de pantotenato	
^c Micronutrientes: 0,003 µM de (NH ₄) ₆ (MO ₇) ₂₄ , 0,4 µM de H ₃ BO ₄ , 0,03 µM de CoCl ₂ , 0,01 µM de CuSO ₄ , 0,08 µM de MnCl ₂ y 0,01 µM de ZnSO ₄	

En comparación con el medio SA, en el medio LM1 se omitieron NaCl, NH₄Cl, tricina y MOPS, la concentración de fosfato (K₂HPO₄ y KH₂PO₄) se incrementó hasta 10 mM (a partir de una disolución madre tampón de pH 7), y se añadió ácido cítrico 0,1 mM para evitar la precipitación de sales de hierro. En los medios designados LM3 y LM5, todos los componentes, excepto el tampón de fosfato y el acetato de sodio, se incrementaron tres y cinco veces, respectivamente. La cifra final en la denominación del medio indica la concentración de glucosa en g/l (por ejemplo, LM1-5 contiene 5 g/l de glucosa). El pH se ajustó usando HCl, y durante la fermentación se añadió automáticamente KOH 2 M o 5 M para mantener el pH. Para los cultivos de 1 litro se usaron vasijas de vidrio con fondo de plato Applikon de 2 litros de volumen total. La velocidad de agitación fue 300 rpm.

Procedimientos de clonación, transformación, PCR y secuenciación de ADN

Las manipulaciones del ADN, incluyendo amplificaciones mediante PCR y secuenciación de ADN, se llevaron a cabo según procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN plasmídico procedente de *E. coli* se aisló usando las columnas Jet Prep (Genomed). *L. lactis* se transformó mediante electroporación como se describe por Holo y Nes (1989).

Construcción de plásmidos para la expresión génica y secreción controladas por el pH y por la fase de crecimiento

Se construyó un vector de secreción para *L. lactis* regulado por pH y por la fase de crecimiento combinando el derivado del promotor P170 del plásmido pAMJ586 descrito en el documento WO 98/10079 y Madsen *et al.*, 1999, y depositado bajo el Tratado de Budapest con el número de acceso DSM 11137, con la secuencia señal de Usp45 (van Asseldonk *et al.*, 1990). El plásmido pAMJ586 se digirió con *Bam*HI y *Sal*I, y el gen informador *lac*LM se sustituyó por un fragmento de ADN de 158 pb que contiene el sitio de unión al ribosoma de *lac*LM (Israelsen *et al.*, 1995), el péptido señal Usp45 y un sitio de clonación múltiple en el marco que comprende los sitios de restricción de *Bg*III, *Pst*I y *Sal*I. El sitio de *Pst*I no es único, debido a la localización de un sitio *Pst*I en la secuencia señal. Este fragmento de ADN de 158 pb se sintetizó mediante PCR usando como molde pNZ1020 (plásmido que contiene el péptido señal Usp45) y los cebadores cebador 1 de Usp (5' TAG TAG GAT CCC GGG TCT AGA TTA GGG TAA CTT TGA AAG GAT ATT CCT CAT GAA AAA AAA GAT TAT CTC AGC 3') (SEQ ID NO: 2) y el cebador 2 de Usp (5' ACG CGT CGA CCT GCA GAG ATC TTG TGT CAG CGT AAA CAC C 3') (SEQ ID NO: 3). El producto de la PCR se digirió con *Bam*HI y *Sal*I, y se ligó en pAMJ586, digerido previamente con las mismas enzimas, dando como resultado pSMA610.

pSMA610 no contiene un terminador de la transcripción tras el sitio de clonación múltiple; por lo tanto, se amplificó mediante PCR un terminador de la transcripción de *E. coli*, *rrnCtt'* (Albrechtsen *et al.*, 1990), usando como molde pHBA102 (Albrechtsen *et al.*, 1990) y los cebadores Ter 1 (5' TAG TAG TCG ACA ACC GGG TGT TGG GAG 3') (SEQ ID NO: 4) y *rrnctt XhoI* (5' GGC CGC TCG AGG GCG CAA AAT AGC GAT 3') (SEQ ID NO: 5). El fragmento se digirió con *XhoI* y *SalI*, y se insertó en el sitio de *SalI* de pSMA610. El vector resultante se denominó pAMJ219.

Se construyó un vector de expresión a base de P170 de elevado número de copias, pAMJ325, mediante inserción de un fragmento de PCR que contiene el derivado del promotor P170 potente procedente de pAMJ752 (Madsen *et al.*, 1999), el sitio de unión a ribosoma de *lacLM* y un nuevo sitio de clonación múltiple en el vector de número elevado de copias pTRKH4 (O'Sullivan y Klaenhammer, 1993a). El plásmido pTRKH4 se digirió con *XbaI* y subsiguientemente el extremo se hizo romo con el fragmento de Klenow. El fragmento de PCR se obtuvo mediante amplificación usando como molde pAMJ752 y los cebadores pAK80rev2 (5' CCC ATT TAG CCG TCA TTT CAG 3') (SEQ ID NO: 6) y LBEP041 (5' GTC GAC CTG CAG ACT AGT GAT ATC AGA TCT AGC CAT GGG GAA TAT CCT TTC AAA GTT 3') (SEQ ID NO: 7). El fragmento de la PCR se ligó con su extremo romo en el pTRKH4 tratado con Klenow, para producir pAMJ325. El terminador de la transcripción de *E. coli*, *rrnCtt'*, se insertó en pAMJ325 tras la amplificación mediante la PCR usando como molde pAMJ219 y los cebadores Ter 1 y *rrnctt XhoI* como se describe anteriormente. El vector de expresión resultante de elevado número de copias se denominó pAMJ328. pAMJ325 y pAMJ328 no contienen ningún gen que codifica una señal de secreción.

Clonación de la nucleasa de *Staphylococcus aureus* en los vectores de expresión

Para evaluar la idoneidad de los vectores de expresión para segregar la nucleasa de *Staphylococcus aureus* (SNasa), se amplificó mediante PCR el gen NucB (Davis *et al.*, 1977; Le Loir *et al.*, 1994), que carece del gen que codifica el péptido señal, usando dos cebadores Nuc1 (5' GGA AGA TCT TCA CAA ACA GAT AAC GGC 3') (SEQ ID NO: 8) y Nuc2 (5' ACG CGT CGA CGA ATT CGA TCT AAA AAT TAT AAA AGT GCC 3') (SEQ ID NO: 9). La secuencia subrayada de los cebadores indica los sitios de restricción de *BglII* y *SalI*, respectivamente. Estos cebadores se diseñaron para permitir la amplificación mediante PCR de un fragmento de ADN de 567 pb que incluye la secuencia codificante de los 168 aminoácidos C terminales y 63 pb justo después del codón de parada traduccional. El plásmido PBS::nuc (Le Loir *et al.*, 1994), que contiene el gen de SNasa completo en un fragmento de *EcoRI* de 871 pb, se usó como molde en una reacción de PCR con los cebadores Nuc1 y Nuc2. El fragmento amplificado se digirió subsiguientemente con *BglII* y *SalI*, y se insertó en pSMA610 dando como resultado una fusión traduccional del gen *nucB* al péptido señal Usp45. El plásmido resultante se denominó pAMJ166.

En otro estudio reciente, se ha desarrollado un vector sonda de péptido señal, pΔSPNuc, que se usó para analizar nuevas señales de secreción a partir de *Lactococcus lactis* (Ravn *et al.*, 2000). Se insertó en pΔSPNuc un derivado de péptido señal optimizado de SP310, SP310mut2, que tiene la secuencia MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTSSQ-DAQAAERS (SEQ ID NO: 1), dando como resultado el plásmido p310mut2.

Para explorar el nivel máximo de secreción de la nucleasa, el derivado de P170 más potente, localizado en pAMJ752 (Madsen *et al.*, 1999), se combinó con Usp45 y el péptido señal SP310mut2 optimizado, respectivamente. Para estas construcciones, pAMJ166 y p310mut2 se digirieron con *BamHI* y *SalI*, conteniendo el fragmento de 900 pb el gen que codifica el péptido señal, y el gen de la nucleasa se purificó y se ligó al fragmento de *BamHI-SalI* de pAMJ752 que contiene el promotor P170, el gen de resistencia a eritromicina y el replicón plasmídico de citrato (Israelsen *et al.*, 1995), dando como resultado los plásmidos pSMBI93 y pSMBI109, respectivamente. pSMBI93 y pSMBI109 se transformaron en *L. lactis*, dando como resultado las cepas SMBI105 y SMBI111.

Para la investigación del efecto de un mayor número de copias sobre la secreción de la nucleasa, se construyeron dos plásmidos de expresión de la nucleasa, basados ambos en pAMJ328. pSMBI91 y pSMBI98 se construyeron mediante inserción de los fragmentos de *BamHI-SalI* de 900 pb procedentes de p310mut2 y pAMJ166 en pAMJ328 digerido de forma similar. La transformación de pSMBI91 y pSMBI98 en *L. lactis* dio como resultado las cepas SMBI104 y SMBI106.

Determinaciones de la actividad de nucleasa

La actividad de nucleasa en los sobrenadantes del cultivo se determinó mediante incubación con ADN de salmón sometido a ultrasonidos como sustrato, seguido de la precipitación en ácido perclórico enfriado con hielo y la medida subsiguiente de la absorbancia a 260 nm (A_{260}). Se añadieron 10 μ l de muestra de una dilución apropiada a 500 μ l de tampón de ensayo (1 mg/ml de ADN, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 mM de CaCl_2 , 25 mM de Tris-HCl pH 8,8), y se incubó a 37°C. Después de 30 minutos, se añadieron 500 μ l de ácido perclórico al 4% (p/v) enfriado en hielo. Se dejó que los fragmentos más grandes de ADN precipitaran durante 15 a 30 minutos a 0°C, y finalmente se separaron de los productos de la degradación solubles en ácido mediante centrifugación. Se midió A_{260} en el sobrenadante. Para obtener la A_{260} correspondiente a "tiempo cero" para cada muestra, se mezclaron 500 μ l de tampón de ensayo con 500 μ l de PCA al 4% a 0°C, se añadieron 10 μ l de muestra de una dilución apropiada (tampón de dilución: 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 mM de CaCl_2 , 25 mM de Tris-HCl pH 8,8) y se llevó a cabo la precipitación como se describe anteriormente. Una unidad de nucleasa se define como la cantidad de nucleasa que producirá 1 μ mol de

ES 2 336 647 T3

polinucleótidos solubles en ácido a partir de ADN nativo por minuto. La actividad de SNasa en unidades por ml de muestra se obtiene a partir de ΔA_{260} mediante la fórmula

$$\frac{[A_{260}(30 \text{ min}) - A_{260}(0 \text{ min})] \times 1,01 \times 100}{10 \times 30}$$

en la que 10 es el coeficiente de extinción milimolar a 260 nm para nucleótidos mixtos, y 1,01 es el volumen final en ml. Para obtener un ΔA_{260} dentro de un intervalo adecuado, las muestras con actividad elevada se diluyeron hasta 0,06-0,12 unidades/ml antes de que se llevase a cabo el ensayo.

Caracterización proteínica y SDS-PAGE

Los sobrenadantes del cultivo se analizaron mediante separación en geles de poliacrilamida al 12% (NOVEX, San Diego, CA, US) en tampón de SDS-tris-glicina según las instrucciones del fabricante. Los geles se tiñeron en azul brillante de Coomassie, R250 (Merck KGaA, 64261 Darmstadt, Alemania), según el fabricante. Para estimar los tamaños moleculares, se usó el marcador de pesos moleculares Mark12™ (NOVEX, San Diego, CA, US).

Determinación bruta del número relativo de copias por célula de los plásmidos con números medios y elevados de copias

Se hicieron crecer cultivos toda la noche en medio GM17 (1,5 x M17 con 5 g/l de glucosa) a 30°C. Los cultivos de la noche se diluyeron 20 veces en medio reciente, y se recogieron muestras de 10 ml durante el crecimiento celular, para la extracción de plásmidos. El ADN plasmídico se extrajo de cantidades iguales de células según el protocolo de O'Sullivan y Klaenhammer (1993b). Cada preparación plasmídica se disolvió en 50 μ l de tampón de Tris-EDTA, y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa tras la digestión con *Sa*II.

Ejemplo 1

Secreción de nucleasa de *S. aureus* en cultivo en matraz y en cultivo en fermentador usando un medio rico en nutrientes

1.1. Cultivo en matraz

Cada uno de los cuatro plásmidos pSMBI91, pSMBI93, pSMBI98 y pSMBI109 que expresan la nucleasa se transformaron en MG1363 de *L. lactis*, y la actividad de nucleasa se determinó tras el crecimiento toda la noche en matraces en medio GM17. En la Fig. 1 se resumen los resultados.

Usando el vector con un número medio de copias, que se basa en la cadena principal de pAK80, el uso del péptido señal Usp45 dio como resultado un rendimiento de alrededor de 18% mayor de nucleasa segregada con relación al uso del péptido señal SP310mut2. La diferencia es ligeramente superior, alrededor de 23%, cuando se usa para expresión el vector pTRKH4 de número elevado de copias. El uso del vector de número elevado de copias incrementó el rendimiento de SNasa segregada en un factor de 2,5-3 con relación al vector de número medio de copias. Este incremento es consistente con el número de copias cuatro veces mayor de pTRKH4 con relación al de pAK80, según se determina mediante electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados). Esto indica que el uso del plásmido de número elevado de copias no conduce a la saturación del sistema de secreción. Los resultados están de acuerdo con los estudios llevados a cabo por Langella y Le Loir (1999), que demostraron una correlación positiva entre el número de copias del plásmido y el rendimiento de SNasa segregada.

1.2. Cultivo en fermentador

En experimentos previos, en los que se usó P170 para dirigir la producción de una β -galactosidasa localizada intracelularmente (Israelsen *et al.*, 1995), se obtuvo un rendimiento 5 veces mayor mediante cultivo a pH bajo de 5,5 en un fermentador, con relación a un cultivo en matraz en el mismo medio. Es probable que este incremento del rendimiento sea simplemente el resultado de que el promotor P170 es activo a lo largo de un período más prolongado de tiempo, en comparación con un cultivo en matraz, en el que el pH disminuye gradualmente debido a la producción de ácido láctico, y sólo alcanza 5,7 a 5,8 muy al final del crecimiento.

A fin de investigar si el uso de una fermentación controlada por pH podría también mejorar los niveles de producción de un producto segregado, se determinaron y se analizaron los rendimientos de nucleasa obtenidos a partir de las cuatro cepas que expresan la nucleasa que se hicieron crecer en medio GM17 a pH 5,5 en fermentadores. Para seguir la cinética de inducción de la expresión génica, se tomaron muestras a diferentes valores de OD₆₀₀, y se analizaron con respecto a la actividad de nucleasa. Como era de esperar a partir de estudios similares con la β -galactosidasa, se observó en las cuatro cepas ensayadas (datos no mostrados) una producción pronunciada de la nucleasa dependiente de la fase de crecimiento. Para las cuatro cepas, el nivel máximo de secreción fue aproximadamente tres a cuatro veces mayor en experimentos en fermentadores, con relación a los experimentos de cultivo en matraz anteriores (Fig. 1). Nuevamente, el uso de Usp45 para la secreción de SNasa fue ligeramente más eficiente (~12-17%) en comparación

con el uso de SP310mut2. El rendimiento máximo fue alrededor de 10 unidades/ml de SNasa segregada usando el vector de número elevado de copias en combinación con el péptido señal Usp45.

5 Ejemplo 2

Expresión de SNasa dependiente del pH y de la fase de crecimiento en un medio sintético usando una fermentación discontinua

10 La inducción de la expresión a partir del promotor P170 a pH bajo durante la transición a la fase estacionaria se ha demostrado previamente en el medio GM17 rico en nutrientes (Israelsen *et al.*, 1995; Madsen *et al.*, 1999). Este medio rico no sería aceptable para la mayoría de las aplicaciones en la producción farmacéutica, debido a que algunos de los componentes son fuentes potenciales de virus animales, priones o factores alérgicos. Por lo tanto, limitaría seriamente el intervalo de aplicaciones del sistema de expresión de P170 si la regulación del promotor dependiese
15 del uso de GM17 u otro medio rico. Los presentes experimentos se diseñaron para determinar si se podría lograr la expresión efectiva de proteínas heterólogas usando el sistema de expresión regulable de P170 en un medio sintético, es decir, definido.

Como un primer ensayo de la expresión y secreción reguladas de SNasa a partir de P170 en un medio sintético,
20 se cultivó la cepa SMB111 en el medio sintético LM1-5, que se basa en el medio SA descrito en Jensen y Hammer, 1993 (véase anteriormente). El medio LM1-5 contiene la misma concentración de glucosa que el GM17, es decir, 5 g/l, y se añadió NaCl 50 mM para compensar la baja concentración del soluto. Se hicieron crecer en paralelo cuatro cultivos en fermentador a pH 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0, respectivamente. Los sobrenadantes de muestras de cultivo tomadas a intervalos desde la fase exponencial a la estacionaria se ensayaron para determinar la actividad de nucleasa. La
25 producción de nucleasa alcanzó 0,81 unidades/ml a pH 5,5, 0,15 unidades/ml a pH 6,0, y siguió estando por debajo de 0,05 unidades/ml en los dos fermentadores mantenidos a pH 6,5 y 7,0, respectivamente.

Estos resultados demuestran claramente que la regulación del pH se mantiene en el medio definido. Además, la expresión de la nucleasa se produjo durante la transición a la fase estacionaria, confirmando un patrón regulador
30 idéntico del promotor P170 en medios definidos y complejos (datos no mostrados).

Los resultados también mostraron que el rendimiento de la producción fue alrededor de cuatro veces menor que el rendimiento logrado usando medio GM17 (0,81 unidades/ml frente a 3,11 unidades/ml, véase la Fig. 1), mientras que la OD máxima fue sólo 25% menor. Es de esperar que los sucesos fisiológicos y metabólicos que acompañan a la
35 transición a la fase estacionaria sean diferentes en el LM1-5 definido y en el GM17. En el cultivo en LM1-5, sólo tres horas separaron el crecimiento exponencial del tiempo cuando se alcanzó la OD máxima y se detuvo la producción de ácido, indicando que la glucosa estaba agotada. Sólo se produjo una cantidad insignificante de nucleasa después de que cesó el crecimiento. En GM17, la producción de la nucleasa se produjo durante un período de seis horas, incluyendo al menos cuatro horas tras la terminación del crecimiento y la producción de ácido. Por lo tanto, es concebible que
40 el medio rico proporcione fuentes alternativas de carbono y energía, que pueden apoyar la síntesis proteica tras el agotamiento de la glucosa.

Se puede concluir a partir de este experimento que el patrón regulador del sistema de expresión dependiente del pH y del crecimiento, observado en un medio complejo rico en nutrientes, como GM17, se mantiene en un medio
45 sintético o definido. Sin embargo, el rendimiento de producto génico heterólogo fue significativamente menor en el medio definido que el rendimiento logrado usando un medio rico.

Ejemplo 3

50 *Productividad y cinética del sistema de expresión de P170 en un medio definido que tiene una concentración elevada de sustrato usando una fermentación discontinua*

En este experimento, se realizó un intento de mejorar el rendimiento de SNasa incrementando la cantidad de
55 componentes del medio. Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos en fermentador, en los que la concentración de glucosa se elevó hasta 15 g/l y 30 g/l, respectivamente, en el medio basal LM3, es decir, LM3-15 y LM3-30, véase anteriormente. La cepa SMB111 se hizo crecer en estos medios a pH 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0, respectivamente. Como se ilustra en la Fig. 2, las densidades celulares finales no crecieron en proporción con la concentración de glucosa. La falta de relación lineal es más pronunciada a los valores inferiores del pH. Este es un fenómeno bien conocido para
60 las bacterias de ácido láctico, en las que a menudo el crecimiento es inhibido por el ácido láctico u otros productos finales metabólicos antes de que se haya agotado la fuente de carbono disponible (Kashket, 1987; Loubiere *et al.*, 1997). Se supone que el efecto inhibitorio del ácido láctico está relacionado con la capacidad del ácido no disociado para difundirse a través de la membrana celular, provocando la acidificación del citoplasma y el desacoplamiento del potencial de membrana. El efecto se hace más importante a valores inferiores de pH, en los que una fracción
65 más grande del ácido láctico/lactato total estará presente en la forma sin disociar. Por lo tanto, el incremento de la concentración de glucosa sólo dará como resultado un mayor rendimiento de la biomasa hasta un cierto nivel, que depende del pH (Fig. 2).

De este modo, a fin de mejorar la producción de proteínas heterólogas tales como SNasa usando el promotor P170, se requiere un balance entre un rendimiento elevado de biomasa, que requeriría un pH elevado, y una actividad elevada del promotor P170, que debería de ser óptima a un pH por debajo de 6,0. Sin embargo, de forma interesante, la producción de SNasa también se produjo en el medio más concentrado, LM3-30, a pH 6,0 y 6,5, mientras que la expresión de SNasa todavía estaba reprimida a pH 7,0 (Fig. 3A-D). La dependencia con la fase de crecimiento se observó claramente a pH 5,5, 6,0 y 6,5 (Fig. 4A-B). También se observó que la densidad celular a la que ocurrió la inducción de P170 fue mayor a mayores valores de pH. Incluso se podría esperar que la SNasa se pudiera producir a pH 7,0, si la concentración de glucosa se incrementase suficientemente.

La producción de SNasa en el medio LM3-30 a pH 6,5 se analizó mediante SDS-PAGE (Fig. 5). La banda de proteína a 22 kDa de SNasa se detectó claramente después de la transición a la fase estacionaria (Fig. 5, línea 5). Parece que el sobrenadante sólo contiene una pequeña cantidad de otras proteínas.

Los resultados de estos experimentos también mostraron que el incremento de la concentración de glucosa en el medio definido, de 5 g/l (véase el Ejemplo 2) a 15 g/l, dio como resultado un incremento significativo del rendimiento del producto génico. También se observó que un incremento adicional en la concentración de glucosa, es decir, de 15 a 30 g/l, en el medio LM3, dio como resultado un aumento del rendimiento de SNasa a pH 6,0 y 6,5 de 3,7 y 12 veces, respectivamente.

Ejemplo 4

Inducción, en un procedimiento de fermentación discontinuo, de la producción de SNasa en el sistema de expresión de P170 mediante adición de lactato de potasio

Los resultados presentados en las Figs. 3 y 4 sugieren que el ácido láctico puede inducir P170. La concentración de ácido láctico está estrechamente correlacionada con la densidad celular en el cultivo. El efecto inhibidor de lactato sobre el crecimiento celular, y la inducción de P170, dependen ambos del pH. Se llevaron a cabo tres fermentaciones paralelas en medio LM3-30, todas mantenidas a pH 7,0. A $OD_{600} \approx 0,7-0,8$, se añadió lactato de potasio (pH 7,0) o cloruro de potasio hasta una concentración final de 200 mM. Esta concentración de lactato normalmente se alcanzará a $OD_{600} \approx 7$ en medio LM3-30. La adición de ambas sales redujo ligeramente la velocidad de crecimiento, pero sólo la adición de lactato de potasio indujo la producción de SNasa (Fig. 6A-C). Esto muestra que la actividad de P170 en *L. lactis* es inducida por lactato. Desde el punto de vista práctico, la adición de lactato se puede usar para la inducción de la expresión en condiciones que de otro modo no serían óptimas para la actividad del promotor P170.

Ejemplo 5

Incremento adicional del rendimiento del producto génico en el sistema de expresión de P170 incrementando el nivel de sustrato disponible usando un procedimiento de fermentación discontinua alimentada

Como se muestra en el Ejemplo 3, los rendimientos de SNasa a pH 6,0 y 6,5 aumentaron 3,7 y 12 veces, respectivamente, incrementando la concentración de glucosa de 15 a 30 g/l en el medio LM3 en un procedimiento de fermentación discontinua.

Se podría esperar que una optimización adicional incluyese el uso de concentraciones de glucosa incluso mayores. En experimentos de fermentación discontinua que usan otras construcciones de cepas basadas en el sistema de expresión de P170, se observó previamente que un incremento de la concentración de glucosa hasta 50-80 g/l dio como resultado mayores rendimientos de producto génico. Sin embargo, el tiempo de fermentación también se prolongó, debido al crecimiento lento provocado probablemente por estrés osmótico (datos no mostrados). Para evitar esto, se estableció un sistema de fermentación discontinua alimentada para la adición gradual de glucosa. Una bomba para la adición de una disolución concentrada de glucosa (500 g/l) se conectó a la salida de la bomba de base del controlador del pH del fermentador. En este montaje, la glucosa se añade en paralelo con la adición de KOH para la regulación del pH. El suministro de glucosa siguió la velocidad de producción de ácido en el cultivo, y estaba estrechamente correlacionado con la densidad celular y la demanda de sustrato. La concentración de otros componentes del medio (excepto acetato y fosfato) se incrementó cinco veces en comparación con LM1, para evitar el agotamiento de los nutrientes a densidades celulares elevadas. La concentración inicial de glucosa fue 5 g/l (medio LM5-5).

Se inoculó SMBI111 en tres fermentadores que contienen medio LM5-5, que se ajustó a pH 5,5, 6,0 y 6,5, respectivamente. La adición de glucosa comenzó cuando la producción de ácido dio como resultado la reducción de pH, y la velocidad de adición se incrementó durante el crecimiento activo. En todos los cultivos, la producción de ácido y la adición de glucosa continuaron después de que se alcanzó la OD máxima. Una gran parte del rendimiento total de SNasa se produjo en esta fase (Fig. 7A-D). A cada pH, el rendimiento total de SNasa se mejoró en comparación con la fermentación discontinua. En la Fig. 8 se resumen los rendimientos finales de SNasa a diferentes valores de pH en los diferentes medios. Se observa claramente que el valor más bajo de pH fue óptimo para la producción de SNasa a concentraciones bajas de glucosa, y que este patrón cambió gradualmente a medida que se incrementaron las concentraciones de glucosa. En estas fermentaciones discontinuas alimentadas, el rendimiento más elevado de SNasa, es decir, 33,1 unidades/ml, se obtuvo a pH 6,5.

Ejemplo 6

Fermentación discontinua alimentada, controlada por pH, con una cepa de vector con número elevado de copias que contiene el sistema de expresión de P170

La cepa SMBI104, que contiene el plásmido pSMBI 91 de número elevado de copias, se hizo crecer en un fermentador en las condiciones que mostraron la cantidad más elevada de SNasa en la cepa SMBI111 (plásmido de número medio de copias), es decir, medio LM5-5 con alimentación de glucosa controlada por pH a pH 6,5 (Fig 9A-B). El rendimiento final que se logró fue 54 unidades/ml, es decir, 64% mayor que el observado a partir de SMBI111 (33 unidades/ml), indicando que el efecto del número de copias puede que no sea tan potente en estas condiciones como en GM17. Es probable que los cuellos de botella en la maquinaria de expresión o en el sistema de secreción sean responsables de la falta de mayores rendimientos cuando se usa el plásmido de número elevado de copias en la fermentación discontinua alimentada. Como parece de la Fig. 9B, el sobrenadante obtenido del crecimiento en medio LM5-5 en este experimento pareció muy puro, con sólo unas pocas proteínas del hospedante contaminantes. Generalmente, la cantidad de producto heterólogo (SNasa) superó el 50% de la proteína total presente en el sobrenadante, y por lo tanto el uso de sólo una o unas pocas etapas de purificación debería de dar como resultado un producto puro de grado farmacéutico.

La capacidad de producción máxima que se obtuvo en estos experimentos usando el sistema de expresión de P170 en *Lactococcus lactis* en condiciones de fermentación discontinua alimentada fue de 54 unidades de SNasa segregada por ml de sobrenadante de cultivo. Basándose en una determinación preliminar de la actividad específica de SNasa (aprox. 550 unidades/mg), esta actividad corresponde a aprox. 100 mg/l de SNasa segregada. Es difícil de comparar la eficacia de los diferentes sistemas de expresión génica, debido al uso de diferentes productos génicos como informadores para la producción de proteínas. Sin embargo, recientemente Langella y Le Loir (1999) describieron el uso de la misma SNasa para estudios de secreción en *L. lactis*. Usando un promotor constitutivo potente y un péptido sintético en un vector de elevado número de copias, estos autores obtuvieron 10-25 mg/l de SNasa segregada en experimentos en matraz usando un medio rico.

Ejemplo 7

Mejora adicional del rendimiento del producto génico obtenido con el sistema de expresión de P170 en un procedimiento de fermentación discontinua alimentada

En nuestros esfuerzos por incrementar posiblemente la capacidad de producción, se llevaron a cabo experimentos discontinuos alimentados adicionales, similares a los experimentos en el Ejemplo 6, pero en los que el medio LM5-5 se suplementó con extracto de levadura en una cantidad en el intervalo de 1 a 10 g/l. A una cantidad de 5 g/l de extracto de levadura, el rendimiento de SNasa segregada aumentó hasta 123 unidades/ml, lo que corresponde a aprox. 225 mg/l de SNasa. Esta es, según nuestro conocimiento, la cantidad más elevada de proteína heteróloga segregada dada a conocer hasta la fecha para bacterias de ácido láctico.

Ejemplo 8

Fase de producción prolongada mediante uso de un montaje de cultivo continuo

En las fermentaciones discontinuas y discontinuas alimentadas descritas en los Ejemplos 1-7, la síntesis del producto heterólogo cesaría eventualmente, bien por falta de glucosa o bien por acumulación de productos metabólicos (principalmente ácido láctico). Aplicando diversos métodos de cultivo continuo, fue posible prolongar la fase de producción. Se ensayaron tres métodos diferentes en experimentos a corto plazo con SMBI111 o la cepa AMJ627 en LM5-50 a 30°C y pH 6,5. Los dos primeros experimentos se llevaron a cabo como un cultivo en phauxostato y un cultivo en quimiostato. El tercer experimento incluyó una fermentación de reciclaje celular, es decir, cultivo a un volumen constante de cultivo con una entrada constante de medio reciente y una salida de medio de cultivo a través de una unidad filtrante.

8.1. Cultivo con phauxostato

El montaje del phauxostato incluyó un fermentador con un volumen de trabajo de un litro, un depósito de 10 l de medio LM5-50 reciente, y un depósito de hidróxido potásico 5 molar. Las bombas para la adición de base y medio al fermentador se apagaron y se encendieron simultáneamente en respuesta al controlador del pH. Se usó una tercera bomba para mantener un volumen constante en la vasija del fermentador, drenando el excedente desde un tubo de nivel. Los depósitos del medio y del tampón se colocaron en balanzas electrónicas, que se usaron para monitorizar las cantidades añadidas. La velocidad de dilución se calculó a partir de estos valores. La relación entre la entrada de flujo de la base y del medio se podría variar cambiando el caudal de la bomba de adición del medio. De ese modo fue posible controlar el número de moles de hidróxido potásico por litro de volumen total añadido. Este número corresponde a la capacidad tamponante del medio, BC_R , en la descripción original del método del phauxostato por Martin y Hemfling (1976). Se espera que la concentración de ácido láctico en un cultivo en phauxostato de *Lactococcus lactis* se aproxime al mismo valor.

La cepa usada para este experimento, AMJ627, fue MG1363, que posee el plásmido pAMJ166. Esta cepa es similar a SMBI111, pero contiene el péptido señal Usp45 y el derivado AMJ586 de P170 en lugar de SP310mut2 y el derivado AMJ752.

La Fig. 10 muestra BC_R , la concentración de lactato, la velocidad de dilución, la densidad óptica, y la actividad de SNasa. Después de una fase inicial de ajuste, la BC_R se estableció a 0,22 moles/l. La concentración de lactato aumentó hasta 0,20-0,23 moles/l, y la actividad de SNasa aumentó hasta 20-30 unidades/ml. Sin embargo, la densidad óptica y la velocidad de dilución fueron disminuyendo constantemente durante esta fase. Presumiblemente, la inhibición del crecimiento fue debida a la producción de lactato.

Después de 20 horas de operación a una BC_R de 0,22 moles/l, el valor se reajustó a 0,11 moles/l. La concentración de lactato disminuyó, y la velocidad de dilución aumentó gradualmente. Durante las siguientes 8,5 horas, la OD_{600} se estabilizó a un valor ligeramente inferior, y la actividad de SNasa disminuyó gradualmente hasta 8 unidades/ml. Cuando la BC_R se reajustó a 0,18 moles/l, la velocidad de dilución disminuyó inmediatamente, pero aumentó de nuevo durante las siguientes 14 horas, mientras que el nivel de SNasa aumentó ligeramente hasta 10 unidades/ml.

Se añadió un volumen total de 10 l de medio reciente. Cuando la adición de medio se detuvo, se dejó que el cultivo creciese hasta la fase estacionaria. La actividad final de SNasa fue mayor que en un cultivo discontinuo paralelo en el mismo medio, 53 unidades/ml frente a 27 unidades/ml.

Aunque el procedimiento no alcanzó un estado estacionario durante este experimento, estaba claro que tanto el crecimiento como la productividad del cultivo reaccionaron a cambios en la relación entre medio e hidróxido de potasio alimentados al fermentador. Se alcanzó un nivel relativamente elevado de SNasa a una capacidad tamponante de 0,22 moles/l, pero, en estas condiciones, la velocidad de crecimiento y la velocidad de dilución fueron disminuyendo. Cuando la capacidad tamponante se redujo primero hasta 0,11 moles/l, y después se incrementó nuevamente hasta 0,18 moles/l, se obtuvo una mayor velocidad de dilución pero un menor nivel de SNasa. Un valor óptimo de la capacidad tamponante se puede encontrar entre 0,18 y 0,22 moles/l.

8.2. Cultivo en quimiostato

Se hizo crecer SMBI111 en tres fermentadores de un litro, con el pH mantenido a 6,5 mediante adición de hidróxido potásico 3M. A un valor de OD_{600} de aproximadamente 5, se comenzó la adición de medio a dos de los fermentadores a diferentes velocidades, 0,07 y 0,14 l/h. El volumen se mantuvo constante mediante una bomba separando mediante drenaje el cultivo a través de un tubo de nivel.

En la Fig. 11 se muestra la densidad óptica y la actividad de SNasa en los cultivos. El cultivo discontinuo alcanzó una OD_{600} máxima de 9,9 en 14 horas, y dejó de producir ácido a las 16 horas. La actividad de SNasa fue 17 unidades/ml al final de la fermentación. Las dos fermentaciones continuas se dejaron funcionar durante 16-17 horas más, dando como resultado una producción global de medio de 1,65 l y 3,0 l, respectivamente. La densidad óptica máxima fue en ambos casos menor que en el cultivo discontinuo, y la disminución en la OD que siguió mostró que la velocidad de crecimiento específica fue menor que la velocidad de dilución (Fig. 11). Sin embargo, el nivel de SNasa continuó aumentando durante al menos seis horas después de que se hubo alcanzado la OD máxima, y sólo se redujo un 10-20% cuando la adición de medio se detuvo 10 horas más tarde. En la tabla a continuación se muestra la actividad de nucleasa global en el cultivo en fermentador, más el cultivo recogido de la salida. (Puede haber tenido lugar algo de producción adicional en el cultivo recogido).

TABLA 2

Actividad de SNasa	Discon-	Continuo,	Continuo,
(unidades) en:	tinuo	0,07 l/h	0,14 l/h
Vasija del fermentador	20.000	33.000	17.000
Salida recogida		40.000	40.000
Actividad total	20.000	73.000	57.000
Unidades/l			
Medio	20.000	27.500	14.300
Duración (horas)	16	32	32
Unidades/hora	1,250	2,280	1,780

Ambas fermentaciones continuas dieron como resultado un mayor rendimiento global de SNasa que el cultivo discontinuo. A la velocidad de dilución más elevada, el rendimiento por litro de medio fue menor que en el cultivo discontinuo. Sin embargo, dependiendo del coste de horas de trabajo en la instalación de fermentación en comparación con el coste de medio, el procedimiento continuo puede todavía ser ventajoso en comparación con una serie de procedimientos discontinuos, que se separarían por tiempo de parada para la preparación del medio y para la limpieza y esterilización del equipo.

En ambos casos, la densidad celular disminuyó después de las primeras 14-15 horas, y la productividad se redujo después de 32 horas. Esto fue provocado probablemente por la inhibición por el lactato producido en el cultivo. Para obtener una producción estable a una mayor densidad, sería necesario reducir la concentración de glucosa en el medio de la entrada hasta un valor en el que se pueda producir menos ácido láctico.

8.3. Cultivo con reciclaje celular y sustitución continua de medio

En los experimentos en quimiostato como se describen anteriormente, la capacidad de producción se redujo debido a la eliminación continua del cultivo desde la vasija. Esto se evitó reciclando las células a la vasija.

Se conectó un dispositivo para la filtración de flujo tangencial (Vivaflow 50, 0,2 μm , Vivascience) a un fermentador de un litro mediante tubería de silicona. Se hizo crecer SMBI111 en medio LM5-50 a pH 6,5 en el fermentador. A una densidad óptica de aproximadamente 5, se comenzó la adición de medio LM5-50 reciente al cultivo, a una velocidad de 0,13 l/h. Al mismo tiempo, se inició la filtración de flujo tangencial del medio procedente del cultivo. El flujo del retenido, que se hizo recircular al fermentador, fue 40-45 ml/min, y la velocidad de filtración, aproximadamente 2 ml/min, se ajustó para mantener constante el volumen de cultivo.

Se alimentó al cultivo un volumen total de 3 l de medio en 24 horas. Durante este tiempo, la densidad óptica aumentó hasta 19,8, y la actividad de SNasa aumentó hasta 41 unidades/ml (Figura 12). El rendimiento global de SNasa fue 112.000 unidades, incluyendo 71.000 unidades en el filtrado recogido.

En este caso, cuando las células de producción no se pierden del cultivo, debería de ser posible continuar el procedimiento hasta que, eventualmente, la filtración estuviese impedida por una densidad celular elevada, o que limitaciones fisiológicas evitasen el crecimiento adicional y la producción de SNasa. Se podría lograr una mejora adicional de la productividad mediante optimización del pH del cultivo, de la concentración de sustrato y de los caudales.

Referencias

Albrechtsen B, Squires CL, Li S y Squires C (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* rrnG leader region. *J Mol. Biol.* **213**:123-134.

Davis A, Moore IB, Parker DS y Taniuchi H (1977). Nuclease B. A possible precursor of nuclease A, an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **252**:6544-6553.

De Ruyter PG, Kuipers OP y de Vos WM (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3662-3667.

Djordjevic GM y Klaenhammer TR (1998). Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol. Biotechnol.* **9**:127-139.

Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154**:1-9.

Grant SG, Jesse J, Bloom FR y Hanahan D (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**:4645-4649.

Holo H y Ness IF (1989). High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmolytically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3119-3123.

Israelsen H y Hansen EB (1993). Insertion of Transposon Tn917 Derivatives into the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:21-26.

Israelsen H, Maden SM, Vrang A, Hansen EB y Johansen E (1995). Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe, pAK80. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2540-2547.

Jensen PR y Hammer K (1993). Minimal Requirements for Exponential Growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:4363-4366.

- Kashket ER (1987)**. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmatic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* **46**:233-244.
- Kok J (1996)**. Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:129-145.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezem M y de Vos WM (1997)**. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* **15**:135-140.
- Langella P y Le Loir Y (1999)**. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD y Langella P (1994)**. Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *J. Bacteriol.* **178**:4333.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD y Langella P (1998)**. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**:1895-1903.
- Loubiere P, Coccagn-Bousquet M, Matos J, Goma G y Lindley ND (1997)**. Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Appl. Microbiol.* **82**:95-100.
- Madsen SM, Arnau J, Vrang A, Givskov M y Israelsen H (1999)**. Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **32**:75-87.
- Martin, G:A. y Hempfling, W.P. (1976)**. A method for the regulation of microbial population density during continuous culture at high growth rates. *Arch. Microbiol.* **107**:41-47.
- Nauta A, van Sinderen D, Karsens H, Smit E, Venema G y Kok J (1997)**. Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling. *Nat. Biotechnol.* **15**:980-983.
- O'Sullivan DJ y Klaenhammer TR (1993a)**. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene* **137**:227-231.
- O'Sullivan DJ y Klaenhammer TR (1993b)** Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2730-2733.
- O'Sullivan DJ, Walker SA, West SG y Klaenhammer TR (1996)**. Development of an expression strategy using a lytic phage to trigger explosive plasmid amplification and gene expression. *Biotechnology (N.Y.)* **14**:82-87.
- Poquet I, Ehrlich SD y Gruss A (1998)**. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**:1904-1912.
- Ravn P, Arnau J, Madsen SM, Vrang A y Israelsen H (2000)**. The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. *Gene* **242**:347-356.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989)**. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanders JW, Venema G, Kok J y Leenhouts K (1998)**. Identification of a sodium chloride-regulated promoter in *Lactococcus lactis* by single-copy chromosomal fusion with a reporter gene. *Mol. Gen. Genet.* **257**:681-685.
- Van Asseldonk M, Rutten G, Oteman, M, Siezen RJ, de Vos WM y Simons G (1990)**. *Gene* **95**:155-160.
- Van Asseldonk M, Simons A, Visser H, de Vos WM y Simons G (1993)**. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* dnaJ gene. *J. Bacteriol.* **175**:1637-1644.
- Van der Vossen JM, van der Lelie D y Venema G (1987)**. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2452-2457.
- Walker SA y Klaenhammer TR (1998)**. Molecular characterization of a phage-inducible middle promoter and its transcriptional activator from the lactococcal bacteriophage phi31. *J. Bacteriol.* **180**:921-931.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un péptido, polipéptido o proteína heterólogo en una bacteria de ácido láctico, comprendiendo el método las etapas de

- (i) construir una bacteria recombinante de ácido láctico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo, y, operablemente enlazadas a ella, secuencias nucleotídicas reguladoras apropiadas, para controlar la expresión de la secuencia codificante,
- (ii) cultivar dicha bacteria recombinante en condiciones de cultivo discontinuo alimentado o de cultivo continuo, para expresar el gen, y
- (iii) cosechar la bacteria recombinante o el péptido, polipéptido o proteína.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que la célula recombinante comprende un promotor constitutivo enlazado operablemente a la secuencia codificante.

3. Un método según la reivindicación 1, en el que la célula recombinante comprende un promotor regulable enlazado operablemente a la secuencia codificante.

4. Un método según la reivindicación 3, en el que el promotor regulable es regulado por un factor seleccionado del grupo que consiste en pH, la temperatura de crecimiento, el contenido de oxígeno, un desplazamiento de temperaturas que provoca la expresión de un gen de choque térmico, la composición del medio de crecimiento, incluyendo la fuerza iónica y el contenido de NaCl, la presencia/ausencia de un constituyente celular esencial o sus precursores, la acumulación de un metabolito intracelularmente o en el medio, la fase de crecimiento de la bacteria de ácido láctico y la velocidad de crecimiento de la bacteria de ácido láctico.

5. Un método según la reivindicación 3 ó 4, en el que el promotor regulable deriva de una bacteria de ácido láctico.

6. Un método según la reivindicación 5, en el que el promotor regulable es el promotor P170 regulable por pH, o un derivado del mismo que es regulable por pH.

7. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el promotor se introduce en la bacteria de ácido láctico en un replicón que se replica autónomamente.

8. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el promotor es un promotor no asociado naturalmente con la secuencia nucleotídica que codifica el péptido, polipéptido o proteína heterólogo.

9. Un método según la reivindicación 1, en el que el péptido, polipéptido o proteína heterólogo se selecciona del grupo que consiste en una enzima y un compuesto farmacéutico activo.

10. Un método según la reivindicación 1, en el que la secuencia nucleotídica codificante está enlazada operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica un péptido señal (SP).

11. Un método según la reivindicación 10, en el que el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en el péptido señal Usp45 y el péptido señal que tiene la secuencia MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISQDAQAERS (SEQ ID NO: 1).

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la bacteria de ácido láctico se cultiva en un medio químicamente definido.

13. Un método según la reivindicación 12, en el que la concentración de glucosa se mantiene a una concentración preseleccionada de al menos alrededor de 0,5 g/l mediante alimentación controlada de glucosa.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que el control de la alimentación de glucosa al medio está enlazado al control del pH.

15. Un método según la reivindicación 12, en el que el medio químicamente definido se suplementa con extracto de levadura.

16. Un método según la reivindicación 15, en el que la cantidad de extracto de levadura está en el intervalo de 0,1-10 g/l.

17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el rendimiento de péptido, polipéptido o proteína heterólogo es al menos 5 mg/l.

ES 2 336 647 T3

18. Un método según la reivindicación 17, en el que el rendimiento de péptido, polipéptido o proteína heterólogo es al menos 100 mg/l.

19. Un método según la reivindicación 18, en el que el rendimiento de péptido, polipéptido o proteína heterólogo es al menos 200 mg/l.

20. El método de la reivindicación 1, que usa un medio basal químicamente definido (medio LM1) para cultivar bacterias, consistiendo el medio en:

Compuesto	Concentración, mM o +/-
L-Alanina	3,4
L-Arginina	1,1
L-Asparagina	0,8
L-Cisteína	0,8
L-Glutamato	2,1
L-Glutamina	0,7
Glicina	2,7
L-Histidina	0,3
L-Isoleucina	0,8
L-Leucina	0,8
L-Lisina.HCl	1,4
L-Metionina	0,7
L-Fenilalanina	1,2
L-Prolina	2,6
L-Serina	2,9
L-Treonina	1,7
L-Triptófano	0,5
L-Tirosina	0,3
L-Valina	0,9
K ₂ SO ₄	0,28 ^a
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	4/6
Acetato de Na	15
CaCl ₂	0,0005 ^a
MgCl ₂	0,52 ^a
FeSO ₄	0,01 ^a
Vitaminas ^b	+
Micronutrientes ^{a,c}	+
Ácido cítrico	0,1

^a De Neidhardt et al. J. Bacteriol. **119**:736-747

^b Vitaminas: 0,4 µM de biotina, 10 µM de piridoxal-HCl, 2,3 µM de ácido fólico, 2,6 µM de riboflavina, 8 µM de niacinamida, 3 µM de tiamina-HCl y 2 µM de pantotenato

^c Micronutrientes: 0,003 µM de (NH₄)₆(MO₇)₂₄, 0,4 µM de H₃BO₄, 0,03 µM de CoCl₂, 0,01 µM de CuSO₄, 0,08 µM de MnCl₂ y 0,01 µM de ZnSO₄.

ES 2 336 647 T3

21. Uso de un medio como se define en la reivindicación 20, en un procedimiento de cultivo discontinuo alimentado o continuo que usa bacterias de ácido láctico.

5 22. El método de la reivindicación 1, que usa un medio químicamente definido (medio LM3) para cultivar bacterias, conteniendo dicho medio químicamente definido (medio LM3) todos los componentes del medio de la reivindicación 20 en cantidades de tres veces, excepto los fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1.

10 23. El método de la reivindicación 1, que usa un medio químicamente definido (medio LM5) para cultivar bacterias, conteniendo dicho medio químicamente definido (medio LM5) todos los componentes del medio de la reivindicación 20 en cantidades de cinco veces, excepto los fosfatos y acetato de sodio, cuyas cantidades respectivas se mantienen al mismo nivel que en el medio LM1.

15 24. El método de la reivindicación 1, que usa un medio químicamente definido como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 20-23, que contiene adicionalmente glucosa en una cantidad en el intervalo de 1-100 g/l.

25. Un método según la reivindicación 12, en el que el medio químicamente definido es el medio definido en cualquiera de las reivindicaciones 20, 22-24.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<u>Cepa</u>		<u>Plásmido</u>	<u>Número de</u> <u>copias</u>	<u>Construcción</u>			<u>SNasa, u/ml</u>
<u>SMBI</u> <u>no.</u>	<u>pSMBI</u> <u>no.</u>	<u>Promotor</u>	<u>SP</u>	<u>Secuencia codificante</u>		<u>Matraz</u>	<u>Fermen-</u> <u>tador</u>
111	109	Medio	P170 310mut2	Nuc		0,88	3,1
105	93	Medio	P170 Usp45	Nuc		1,04	3,4
104	91	Elevado	P170 310mut2	Nuc		2,25	8,7
106	98	Elevado	P170 Usp45	Nuc		2,77	10,2

Fig. 1

Fig. 1

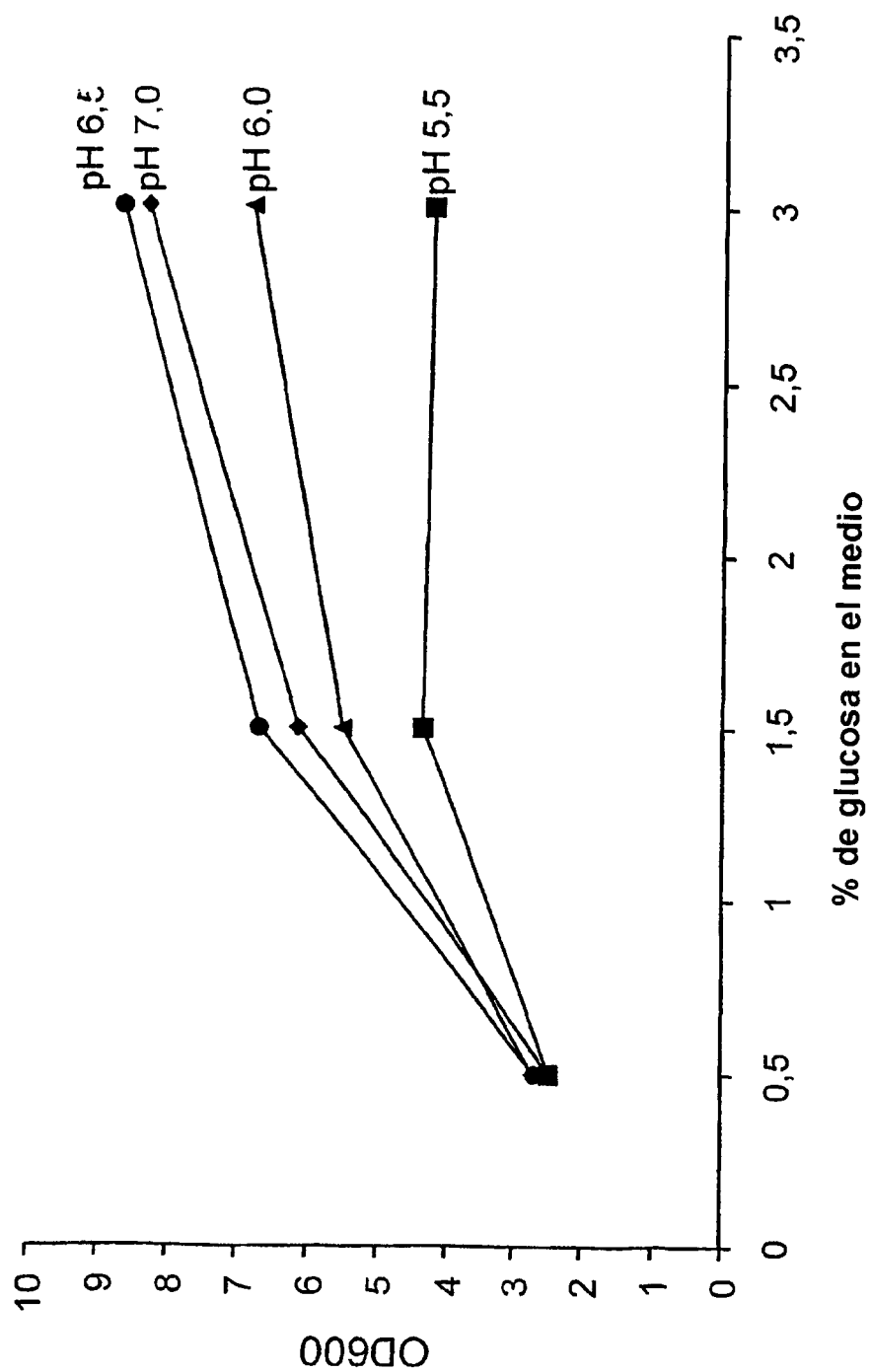


Fig. 2

Fig. 2

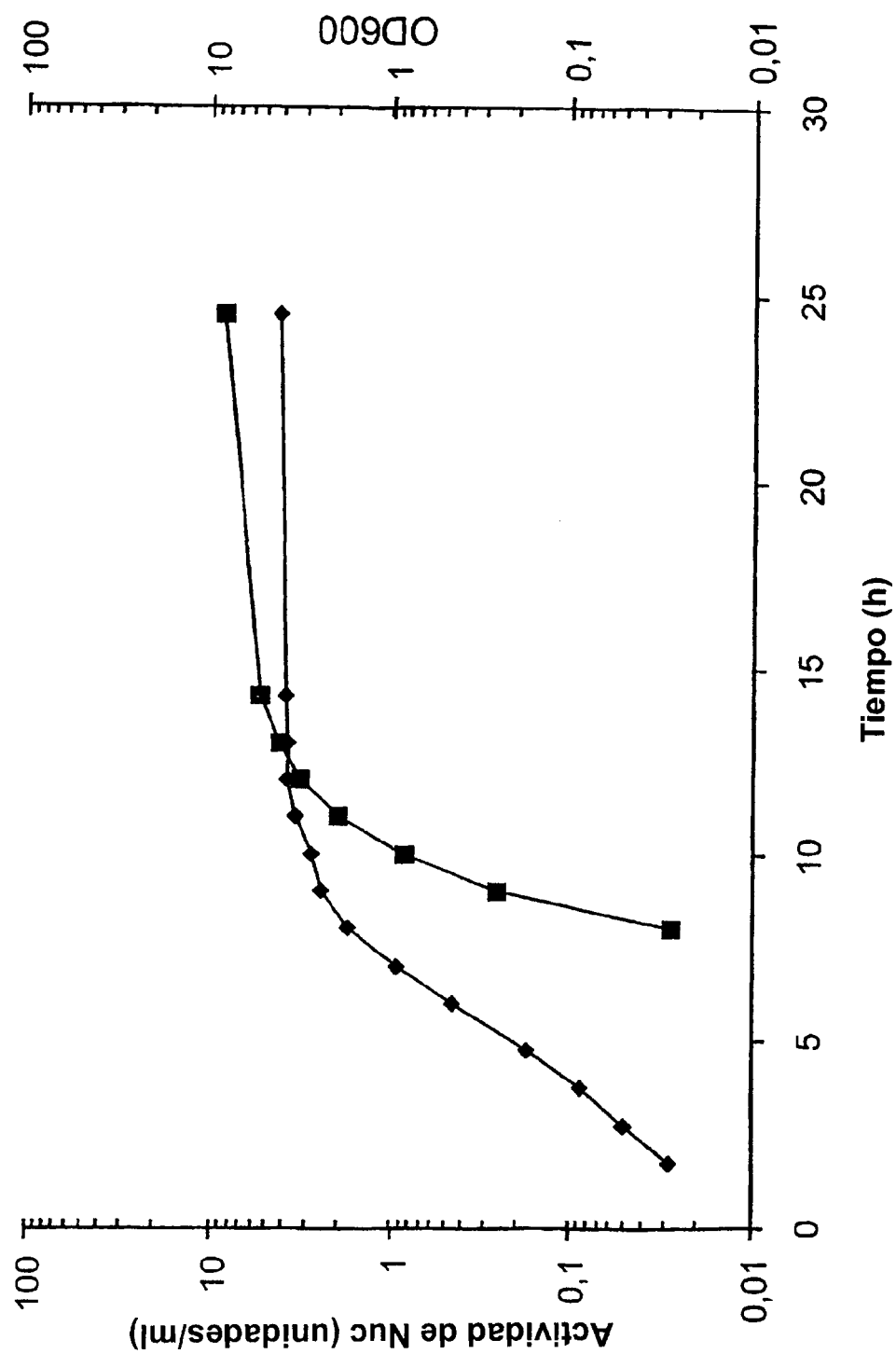


Fig. 3A

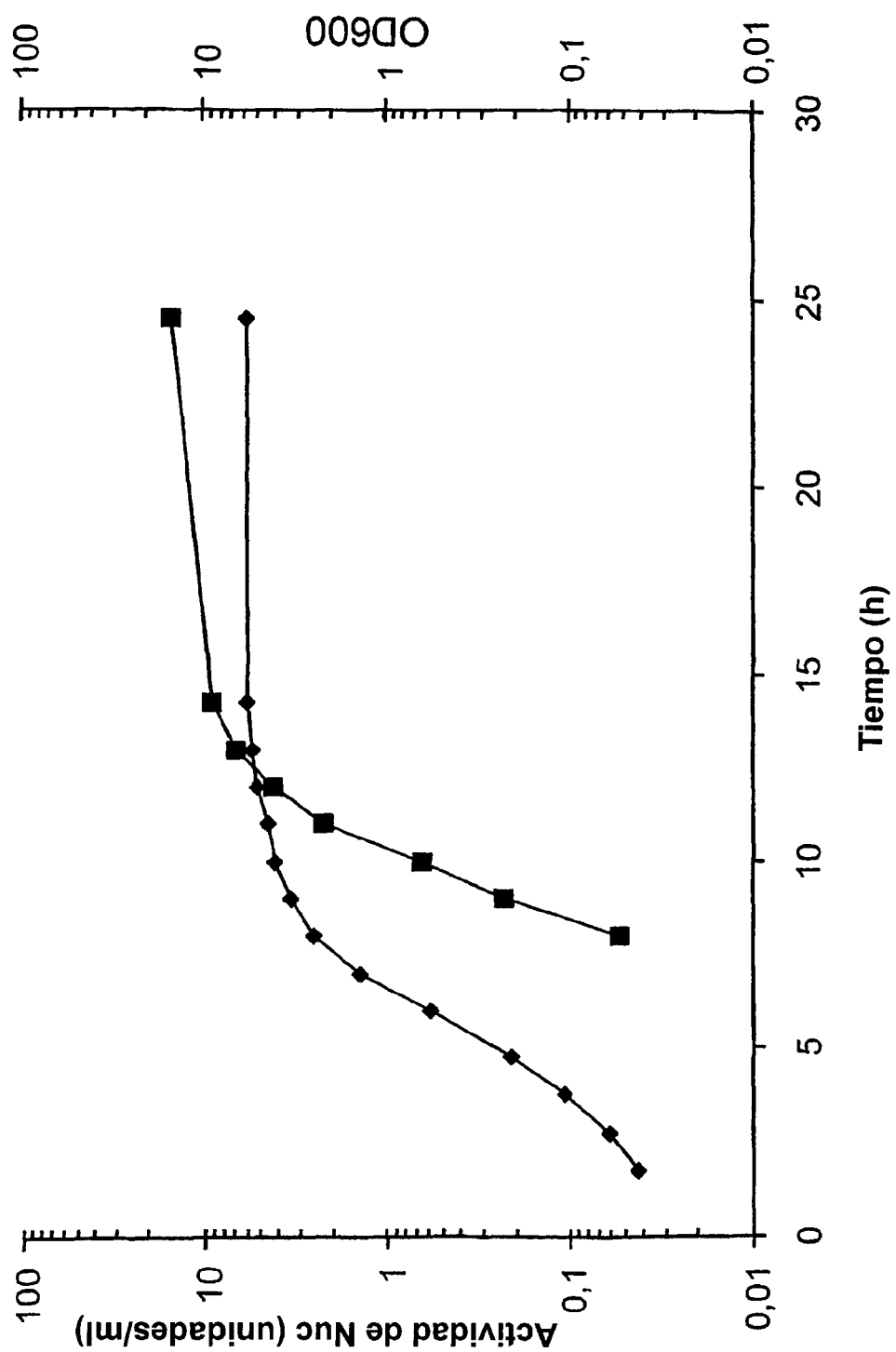


Fig. 3B

Fig. 3B

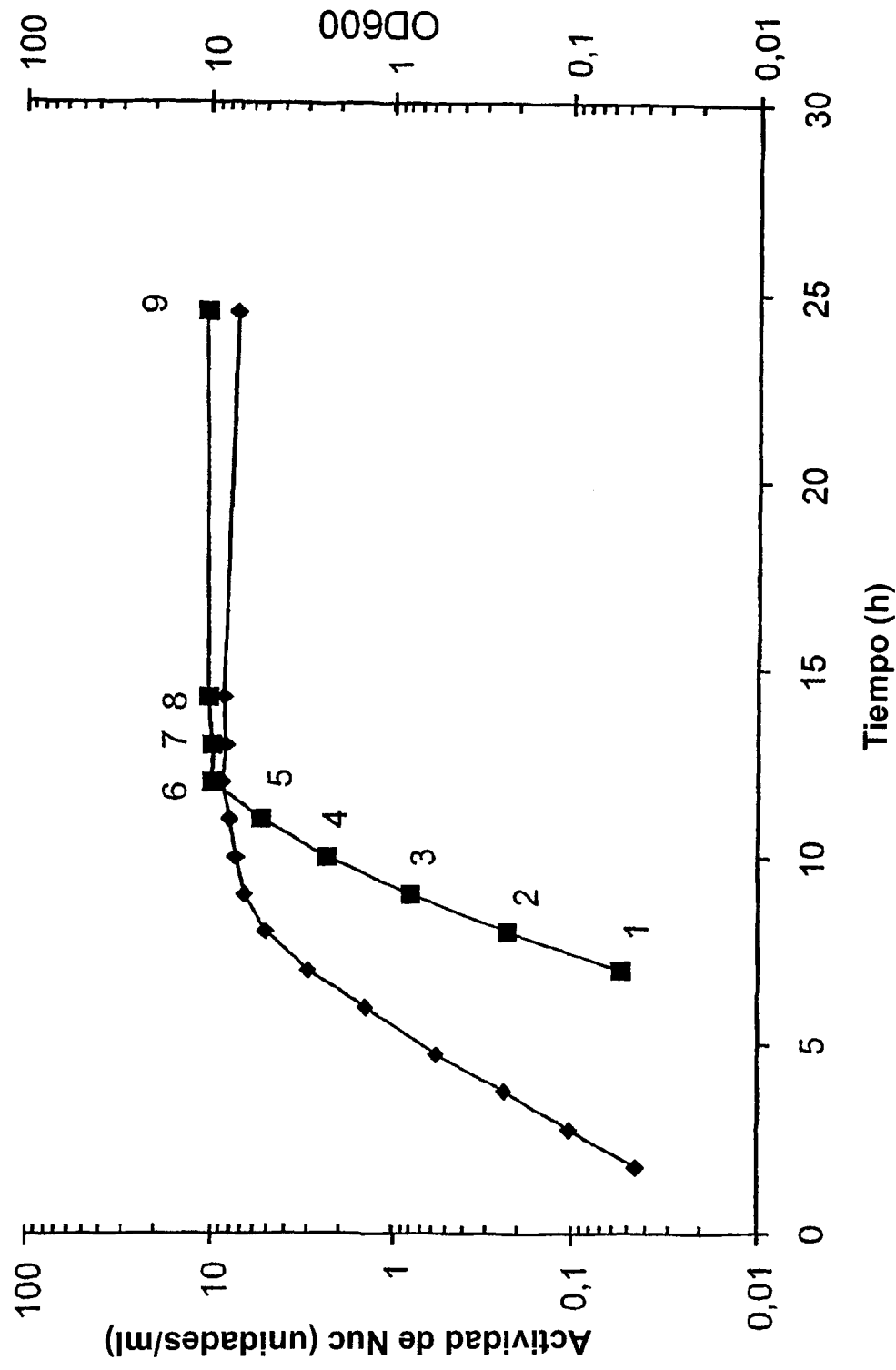


Fig. 3C

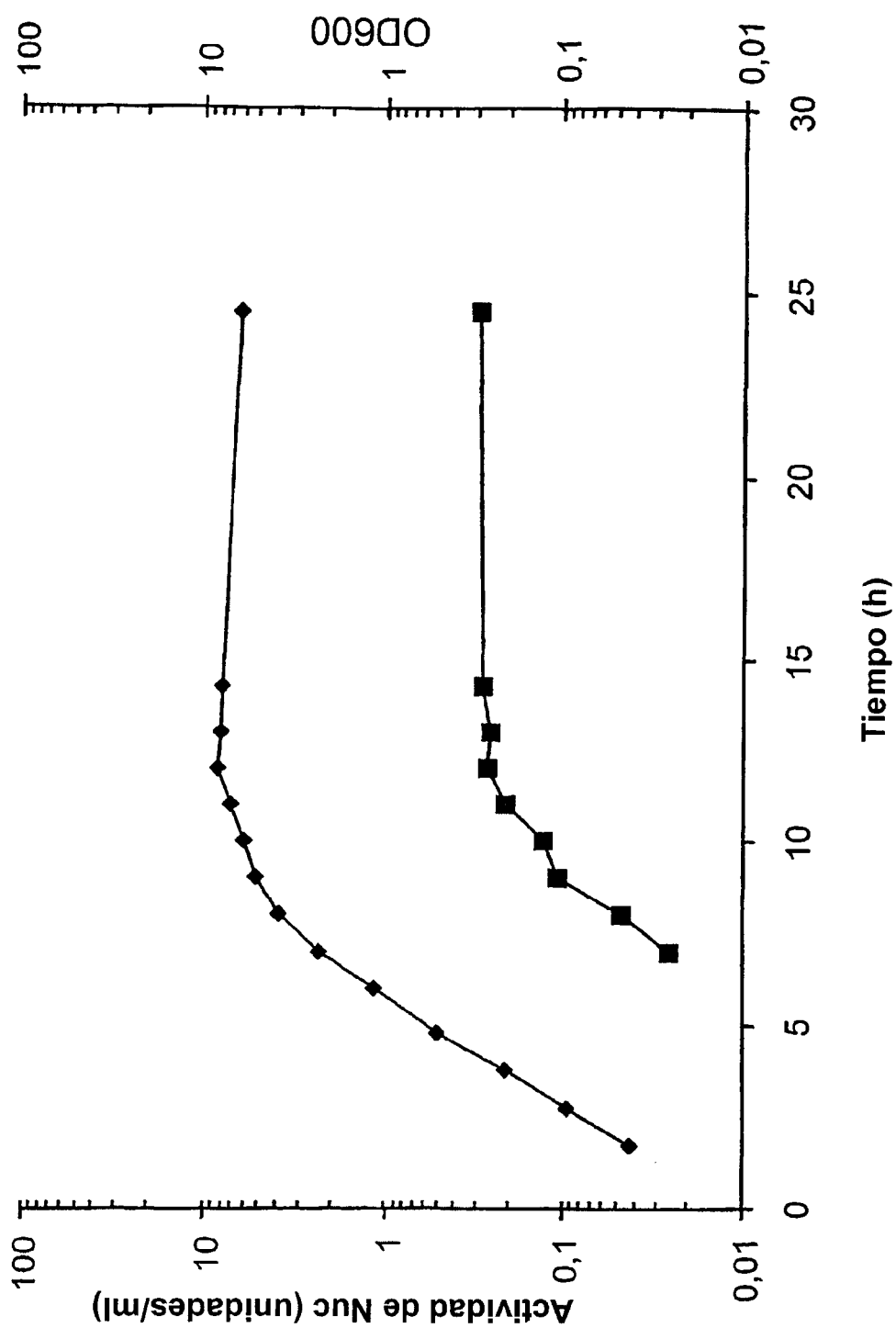


Fig. 3D

Fig. 3D

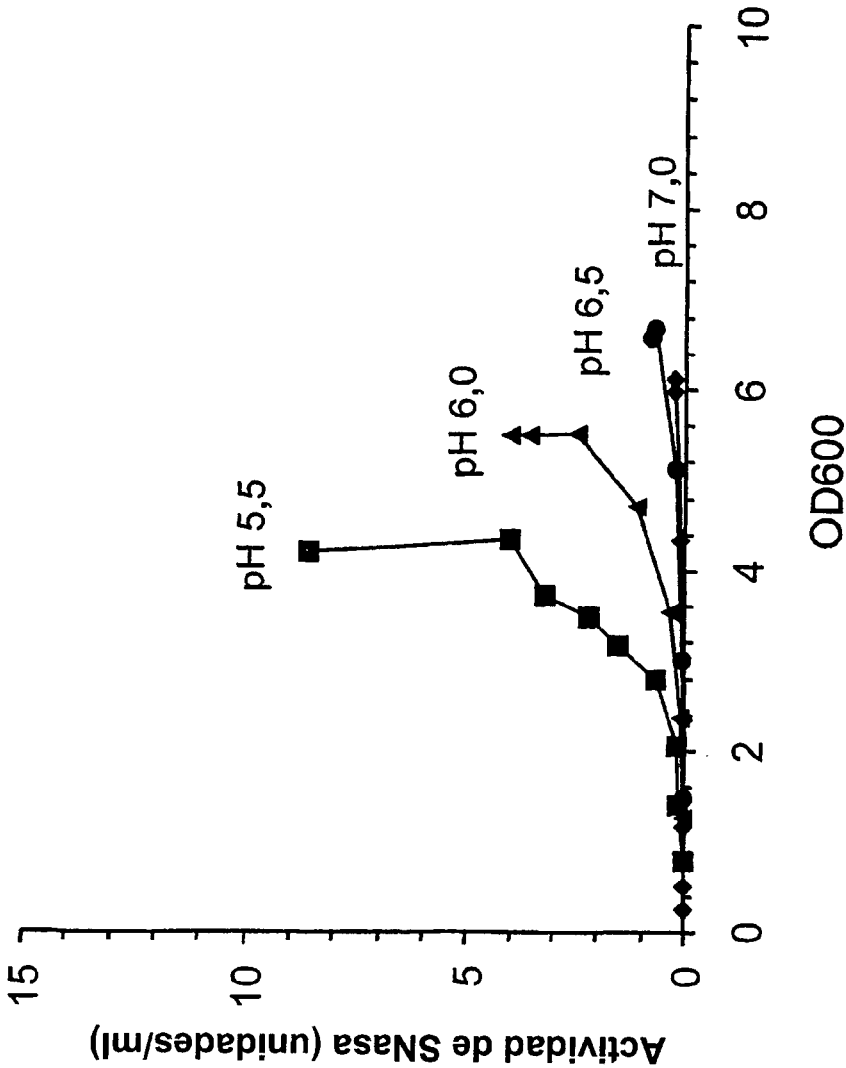


Fig. 4A

Fig. 4A

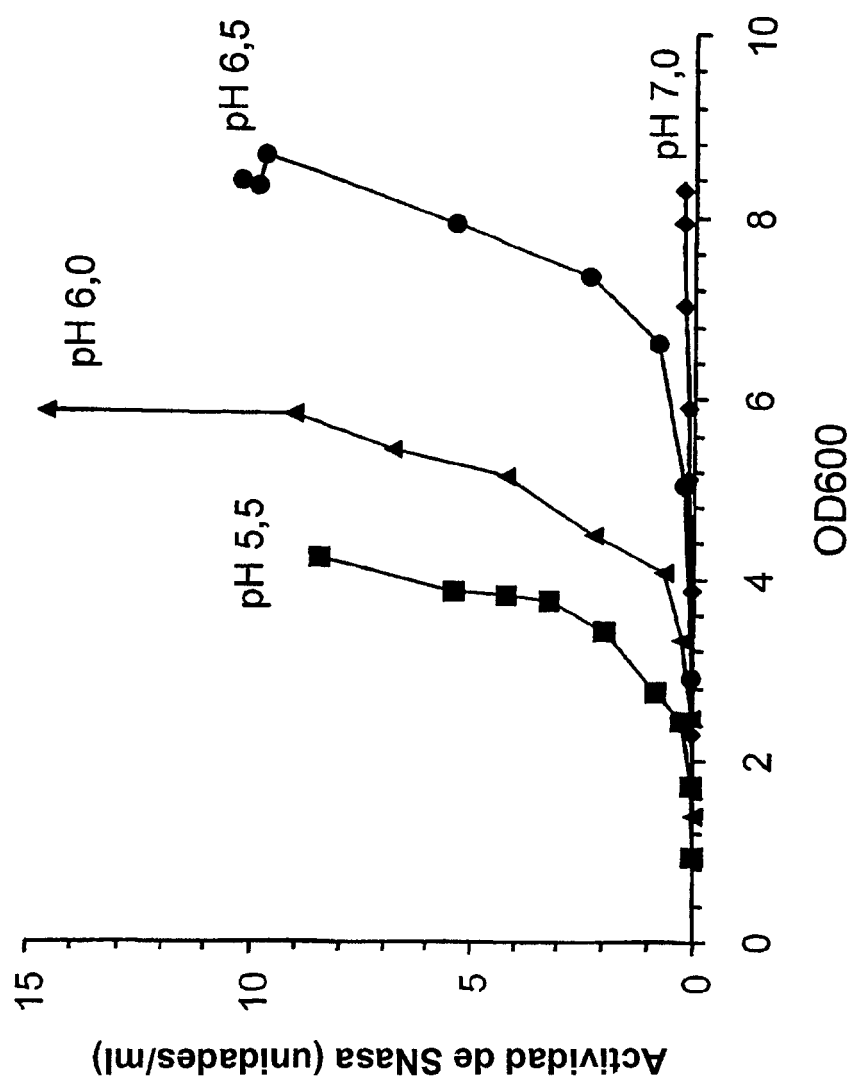


Fig. 4B

Fig. 4B

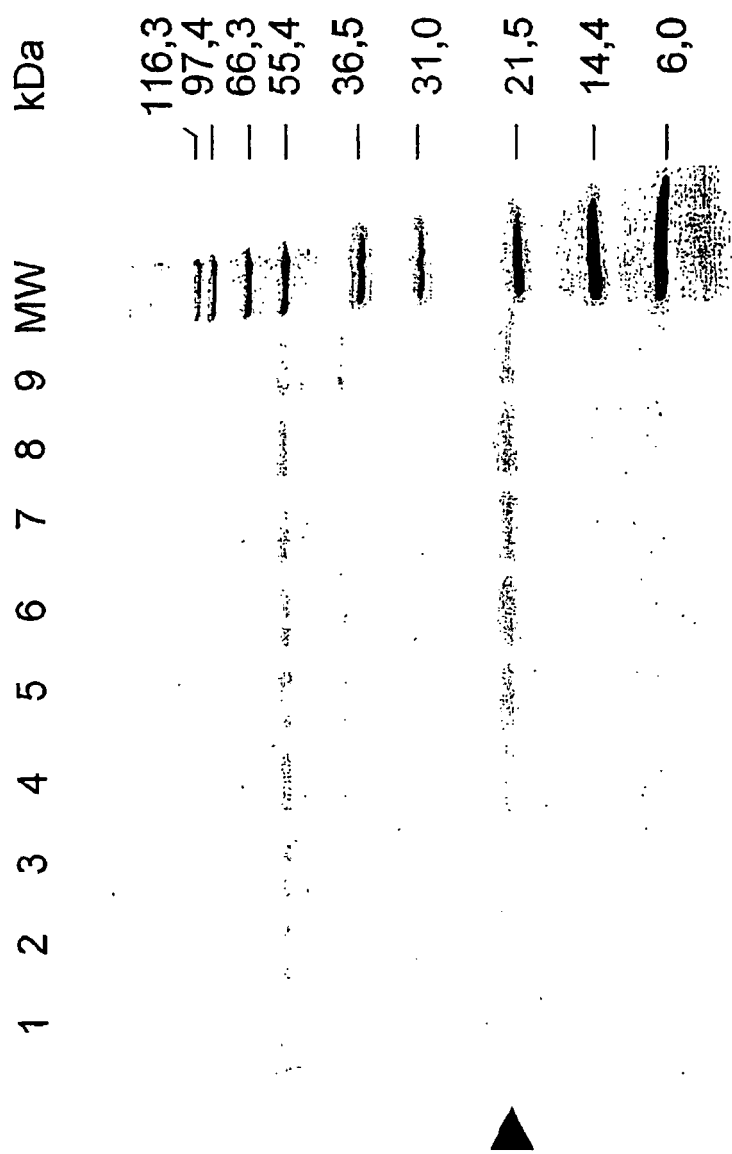


Fig. 5

Fig. 5

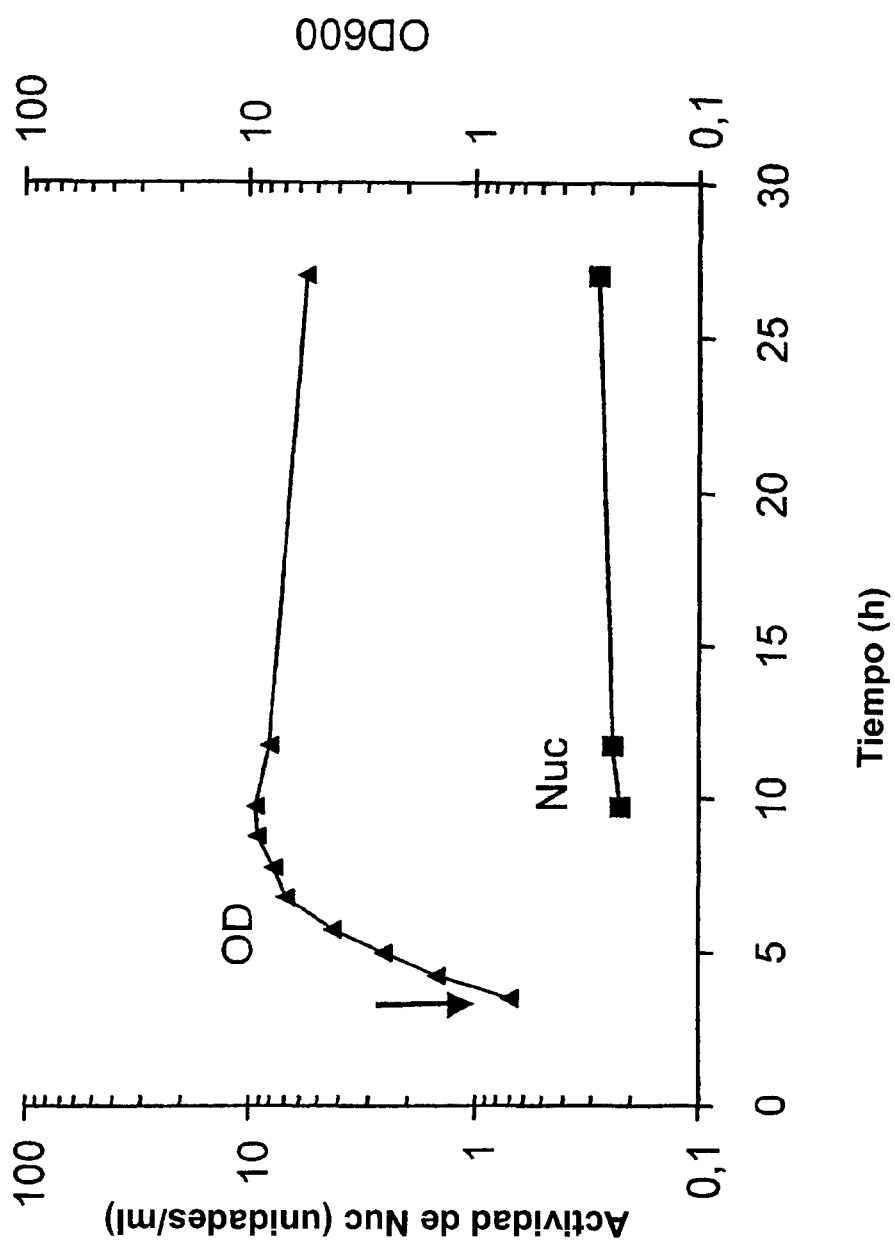


Fig. 6A

Fig. 6A

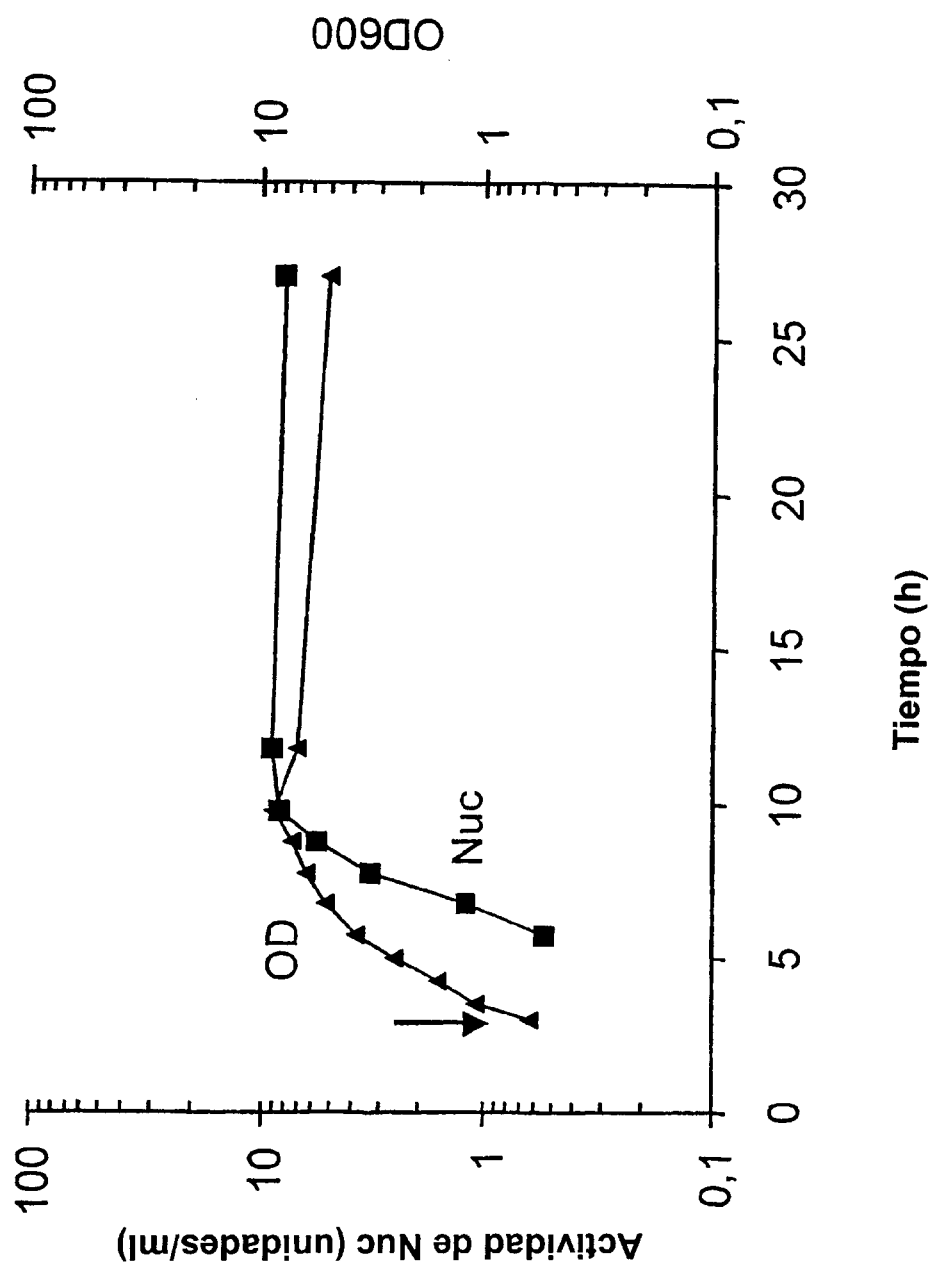


Fig. 6B

Fig. 6B

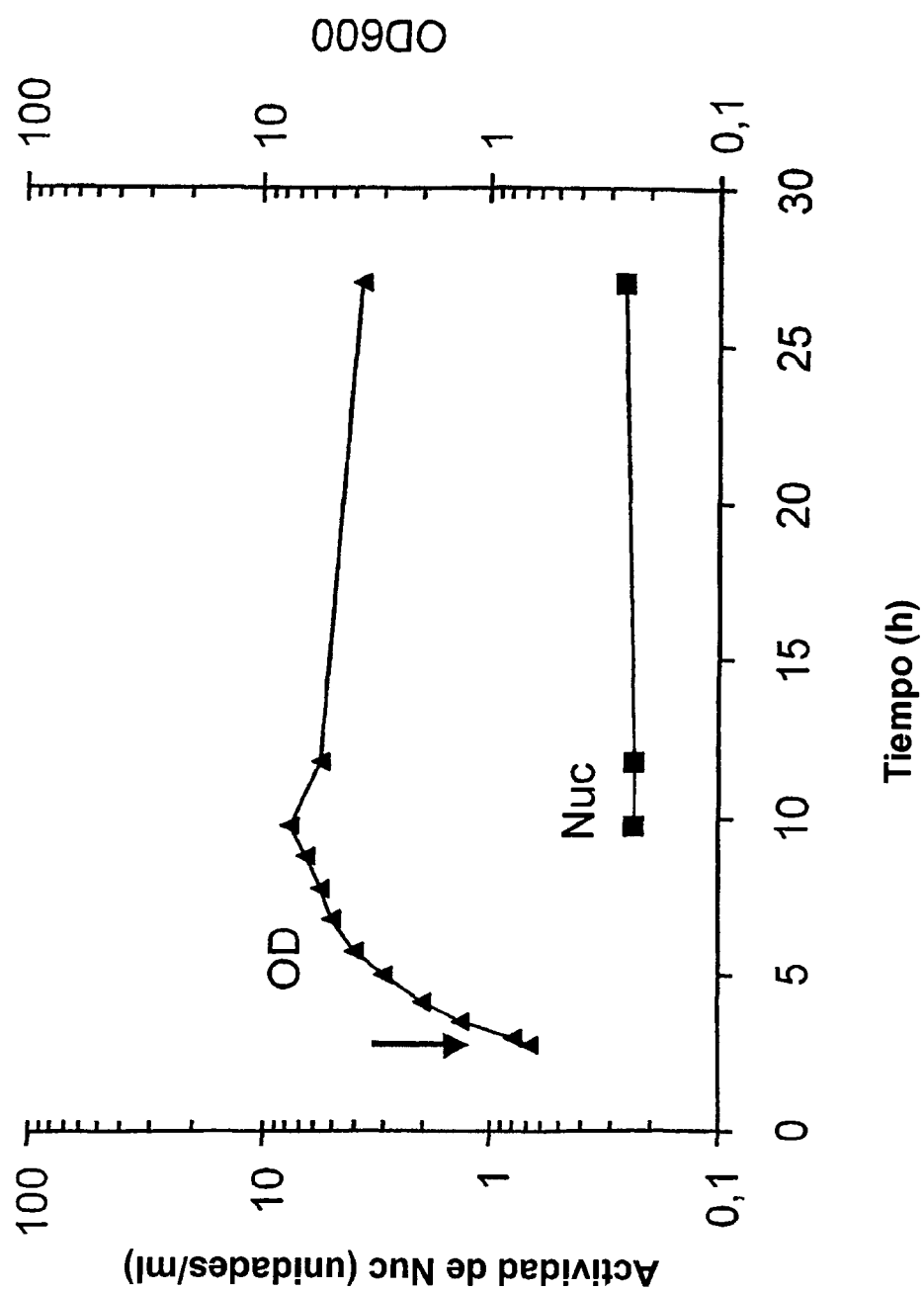


Fig. 6C

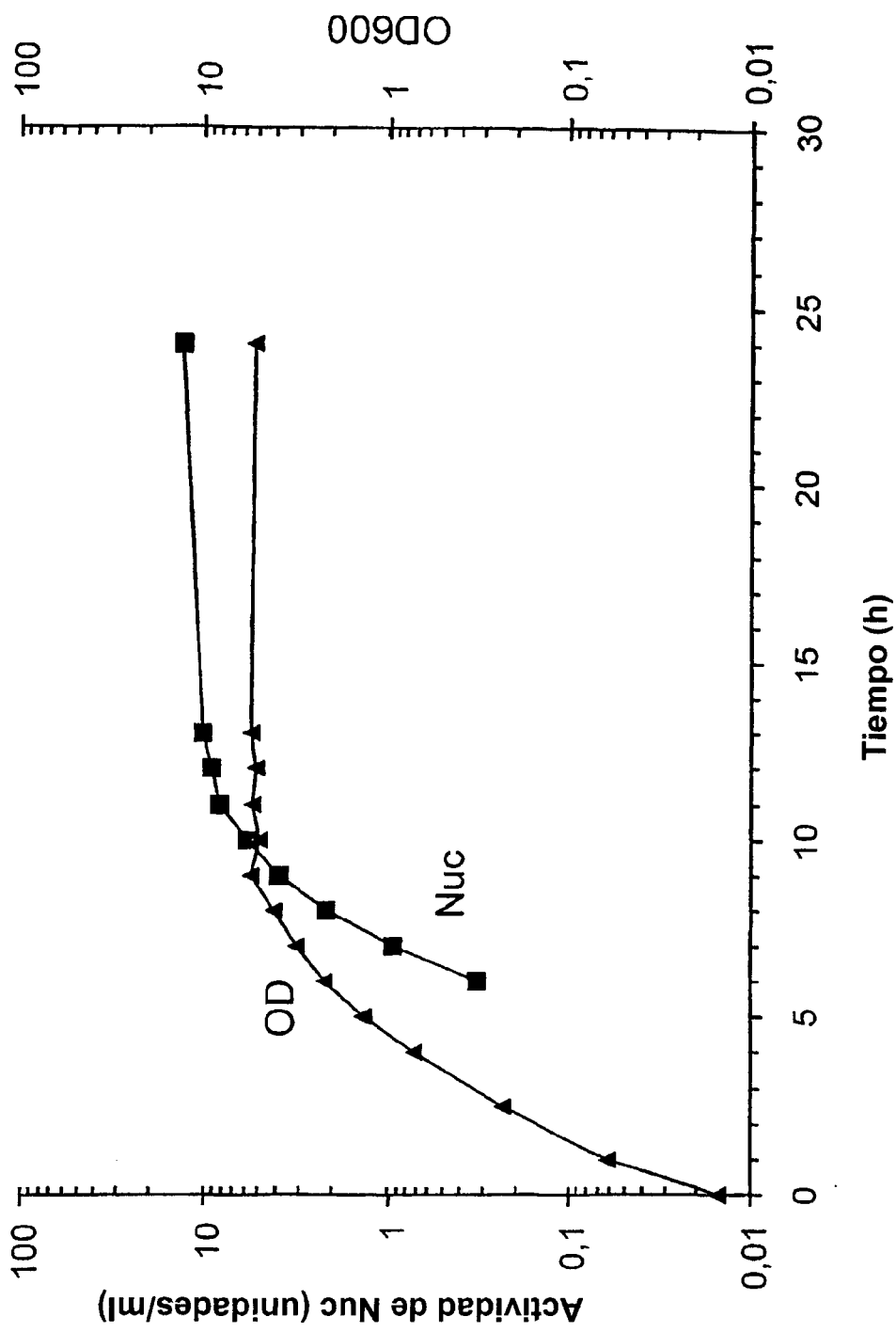


Fig. 7A

Fig. 7A

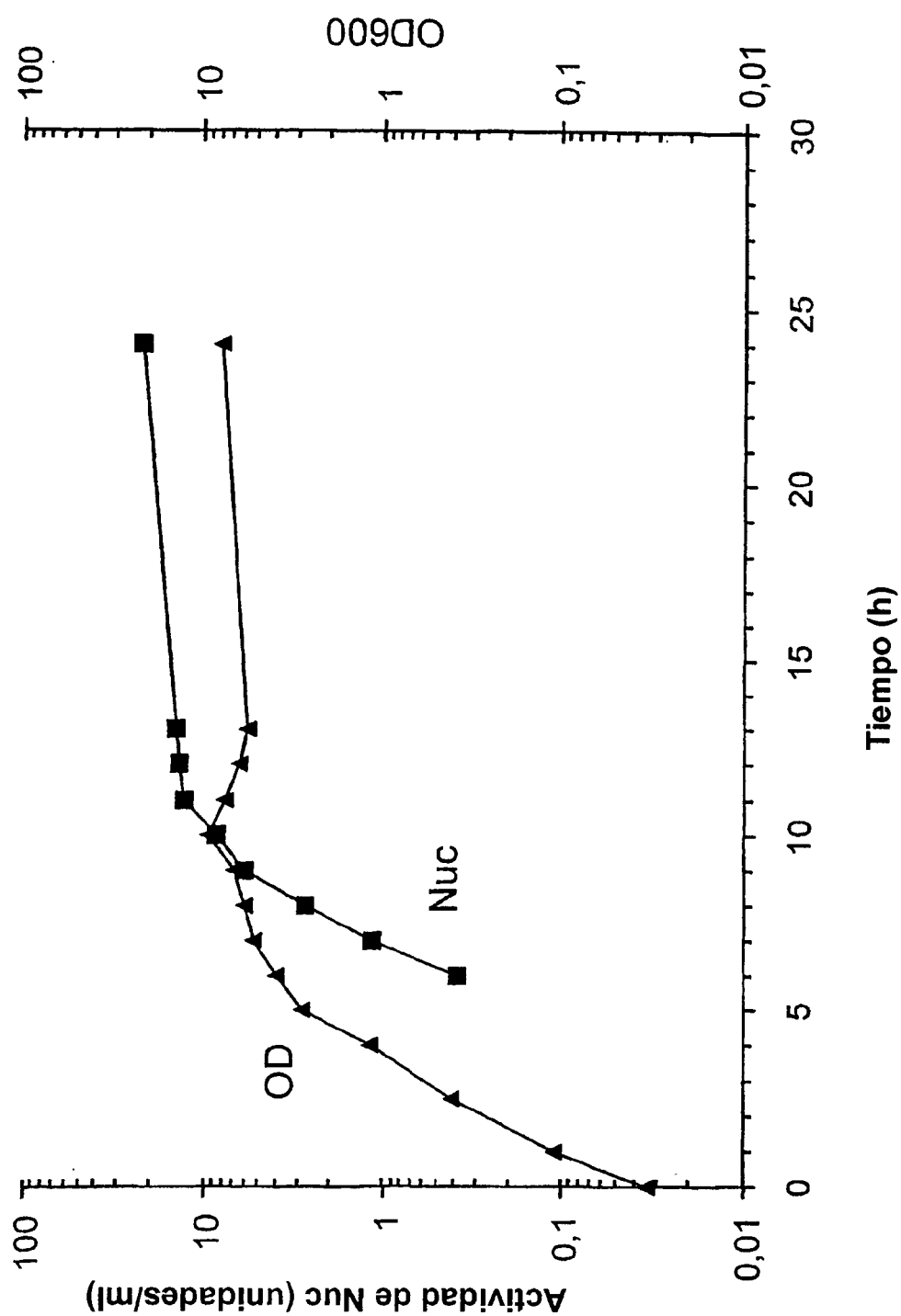


Fig. 7B

Fig. 7B

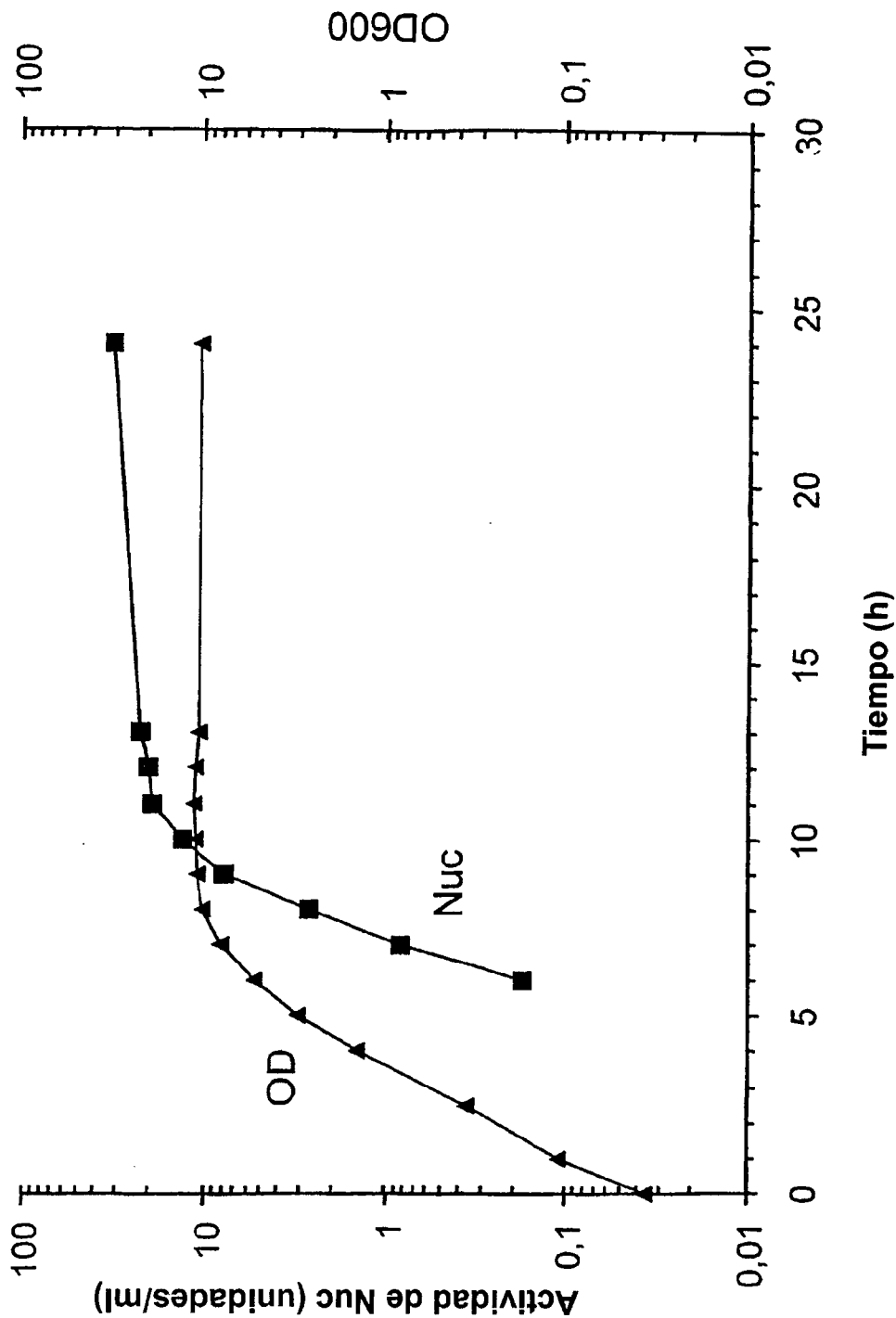


Fig. 7C

Fig. 7C

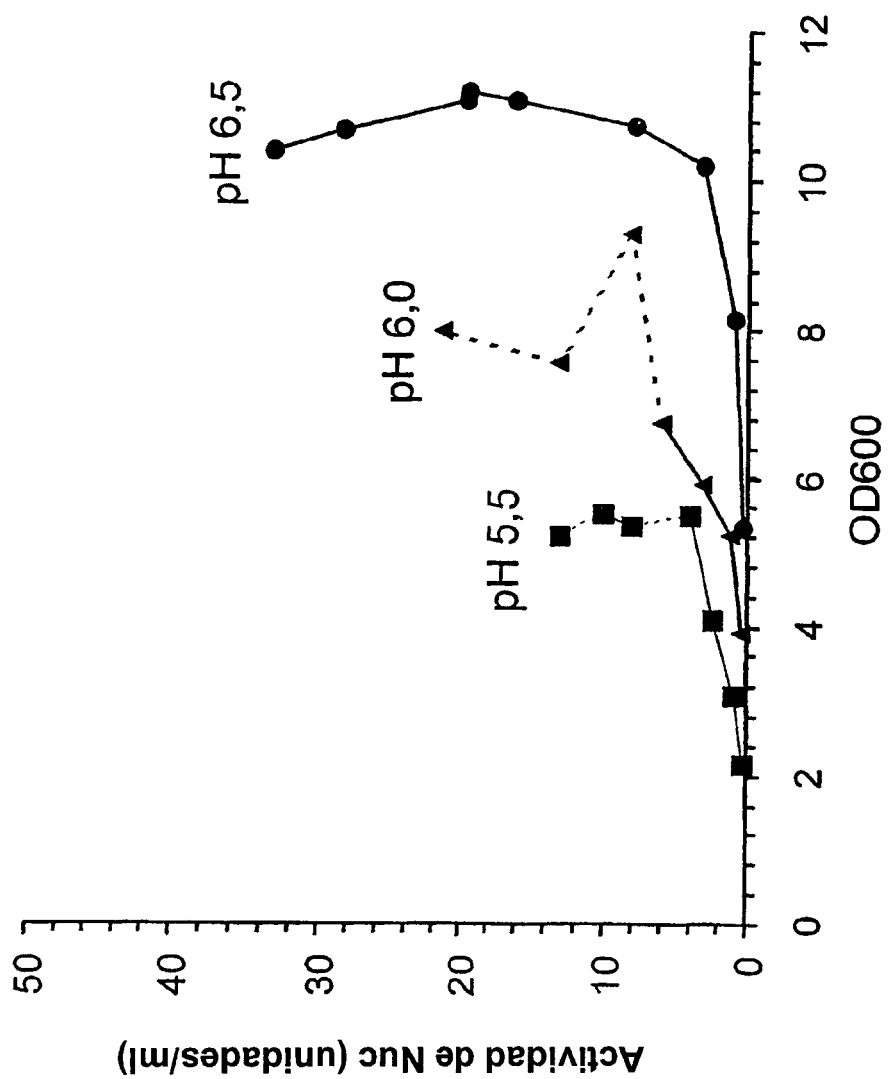


Fig. 7D

Fig. 7D

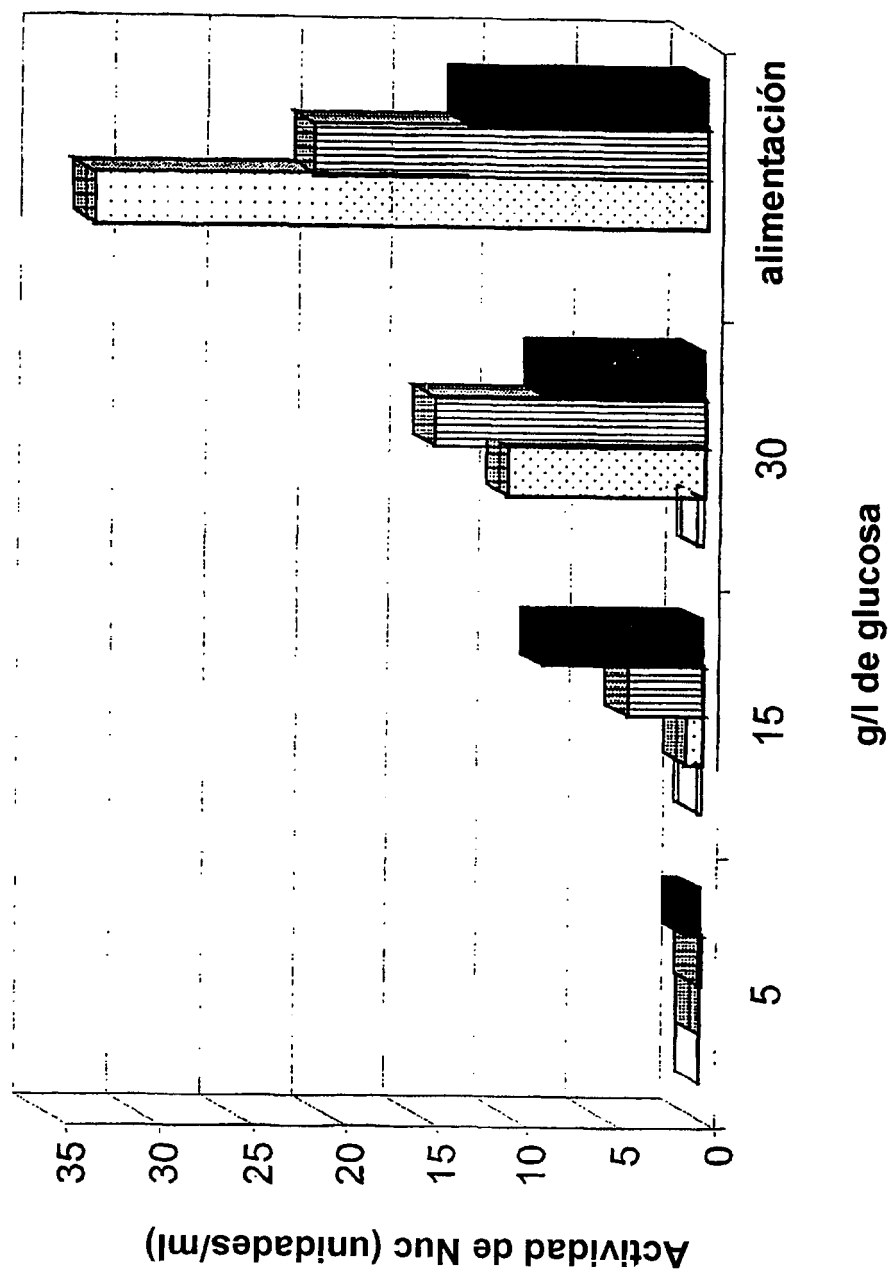


Fig. 8

Fig. 8

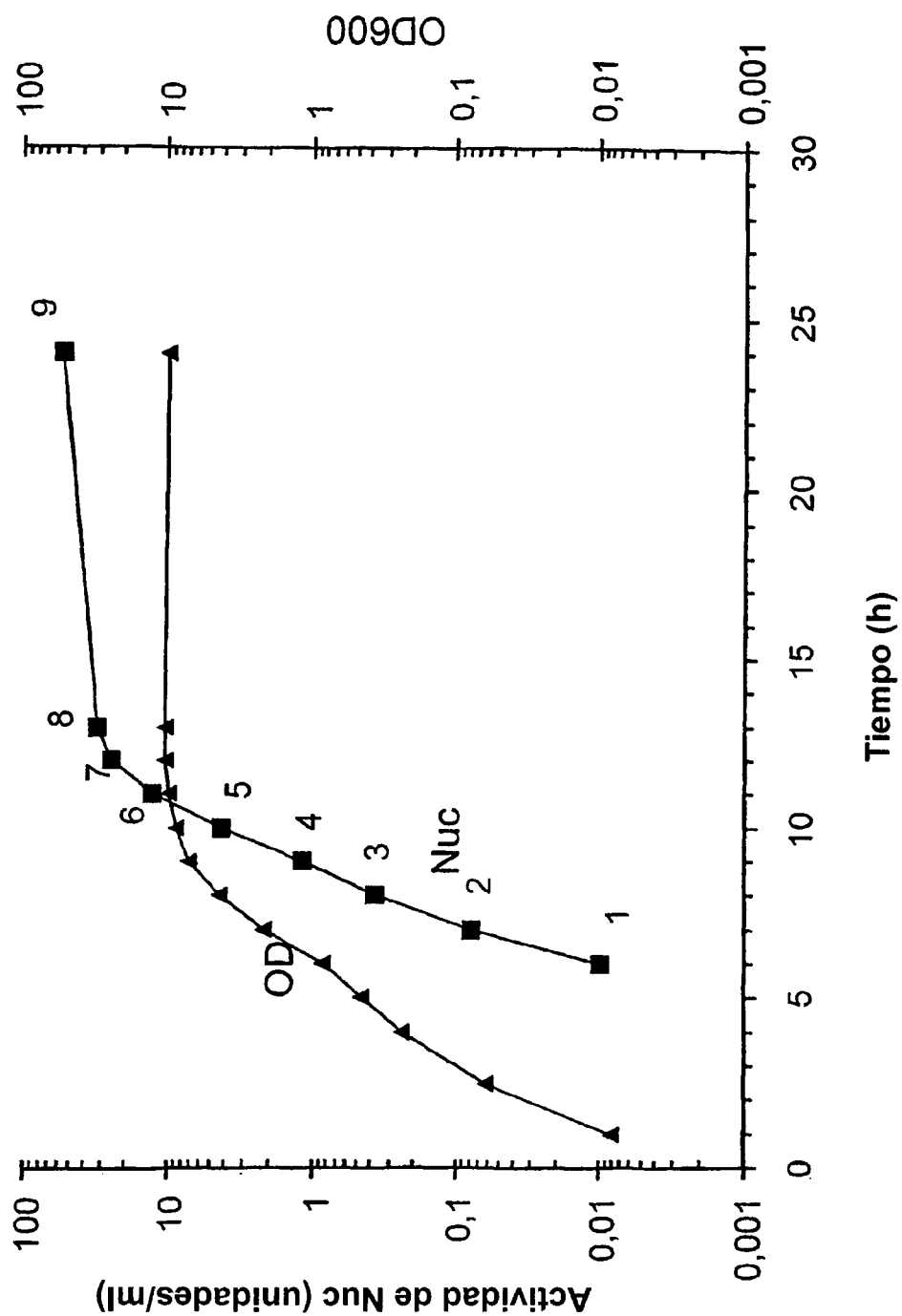


Fig. 9A

Fig. 9A

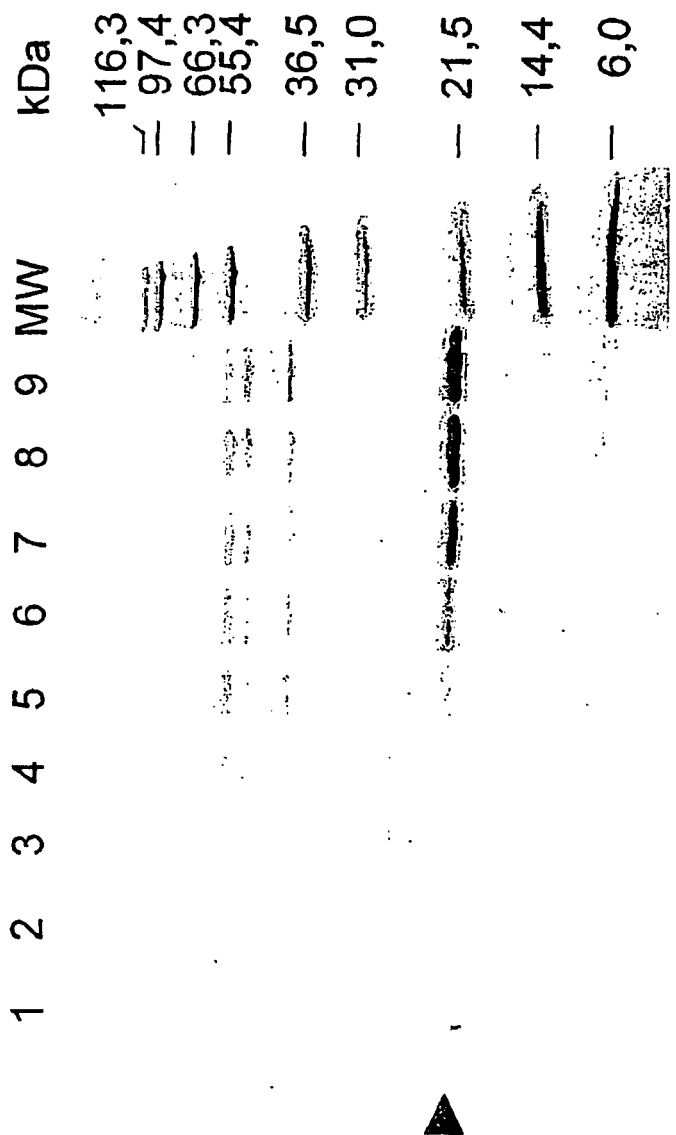


Fig. 9B

Fig. 9B

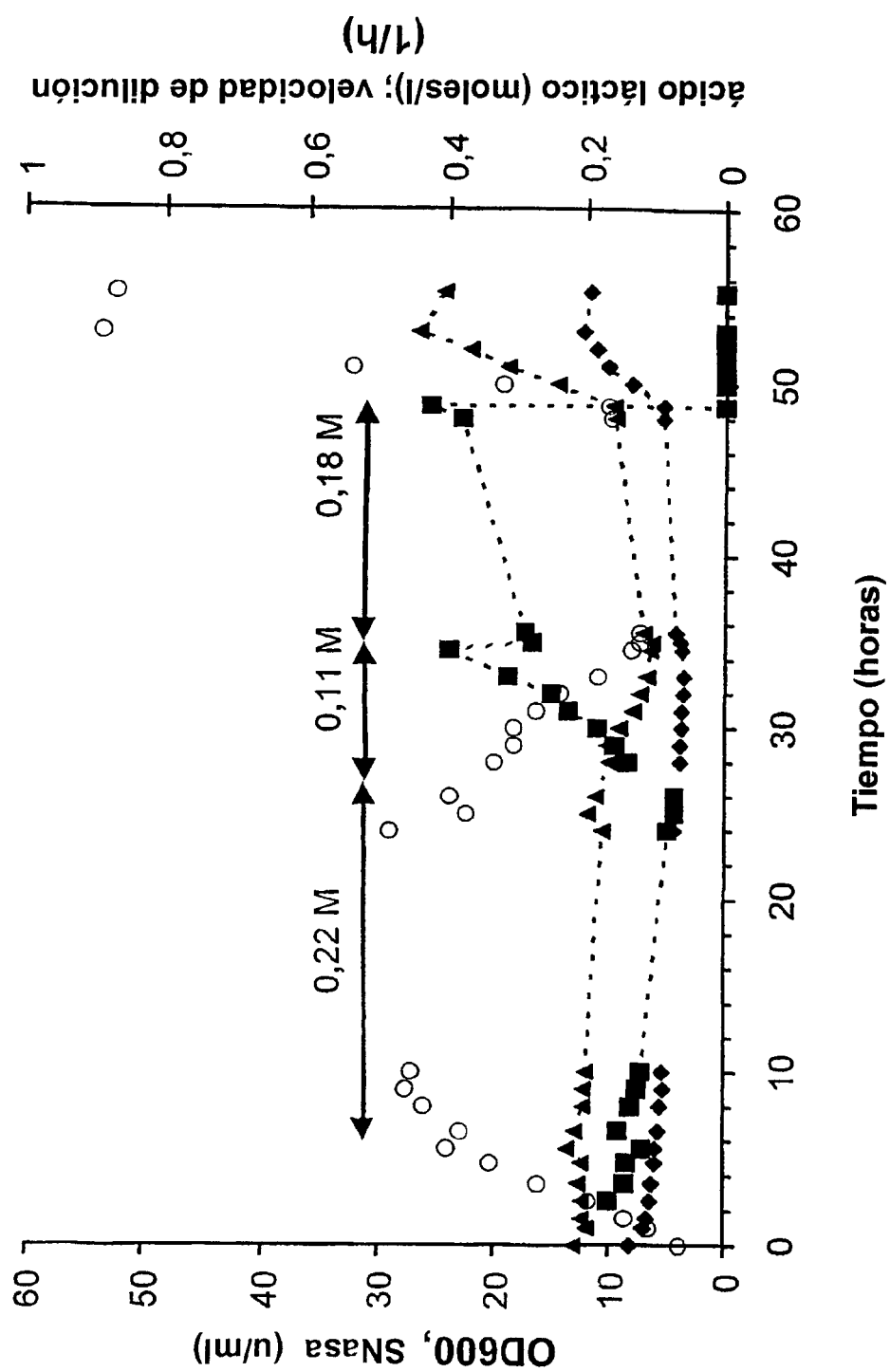


Fig. 10

Fig. 10

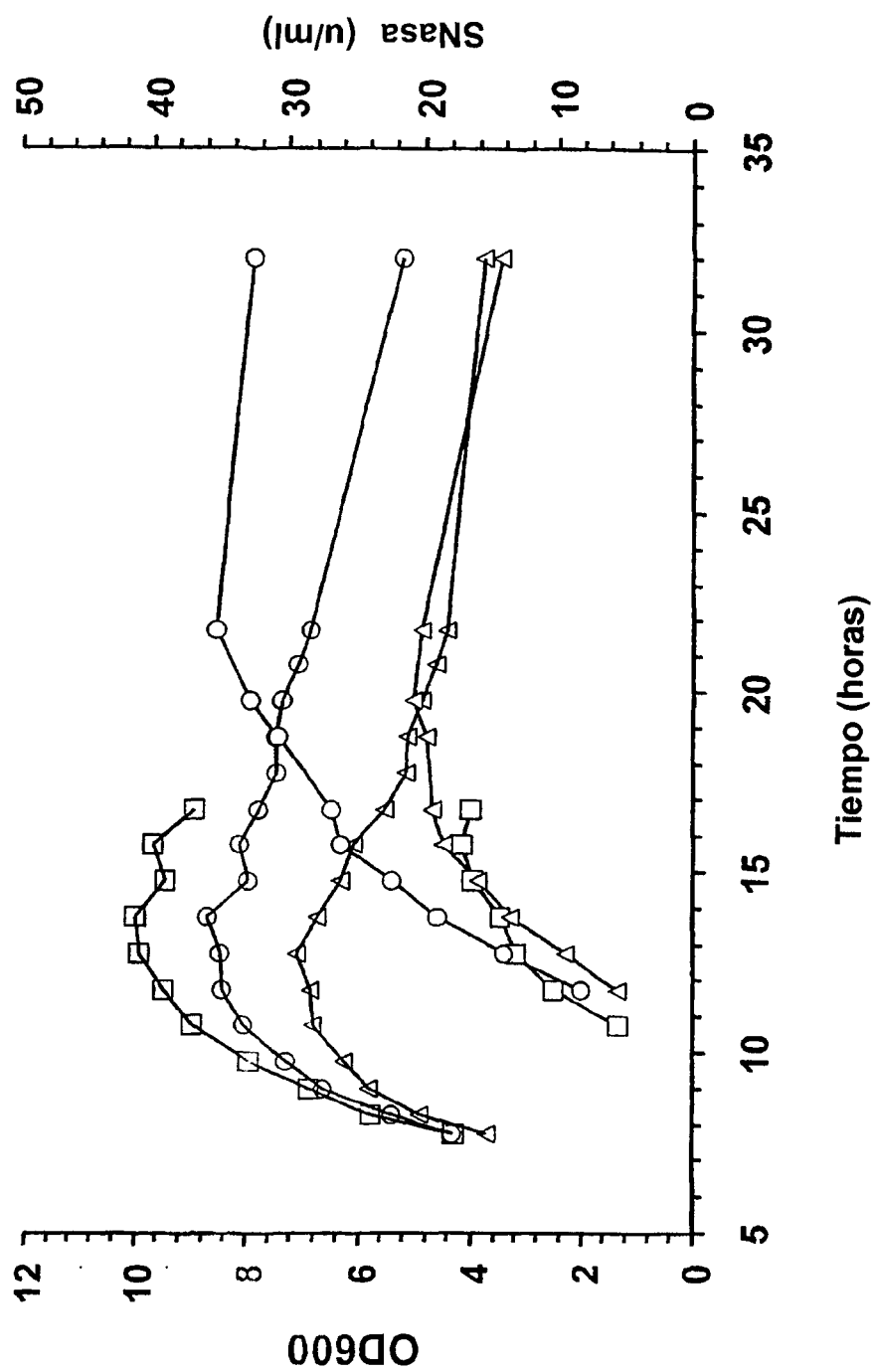


Fig. 11

Fig. 11

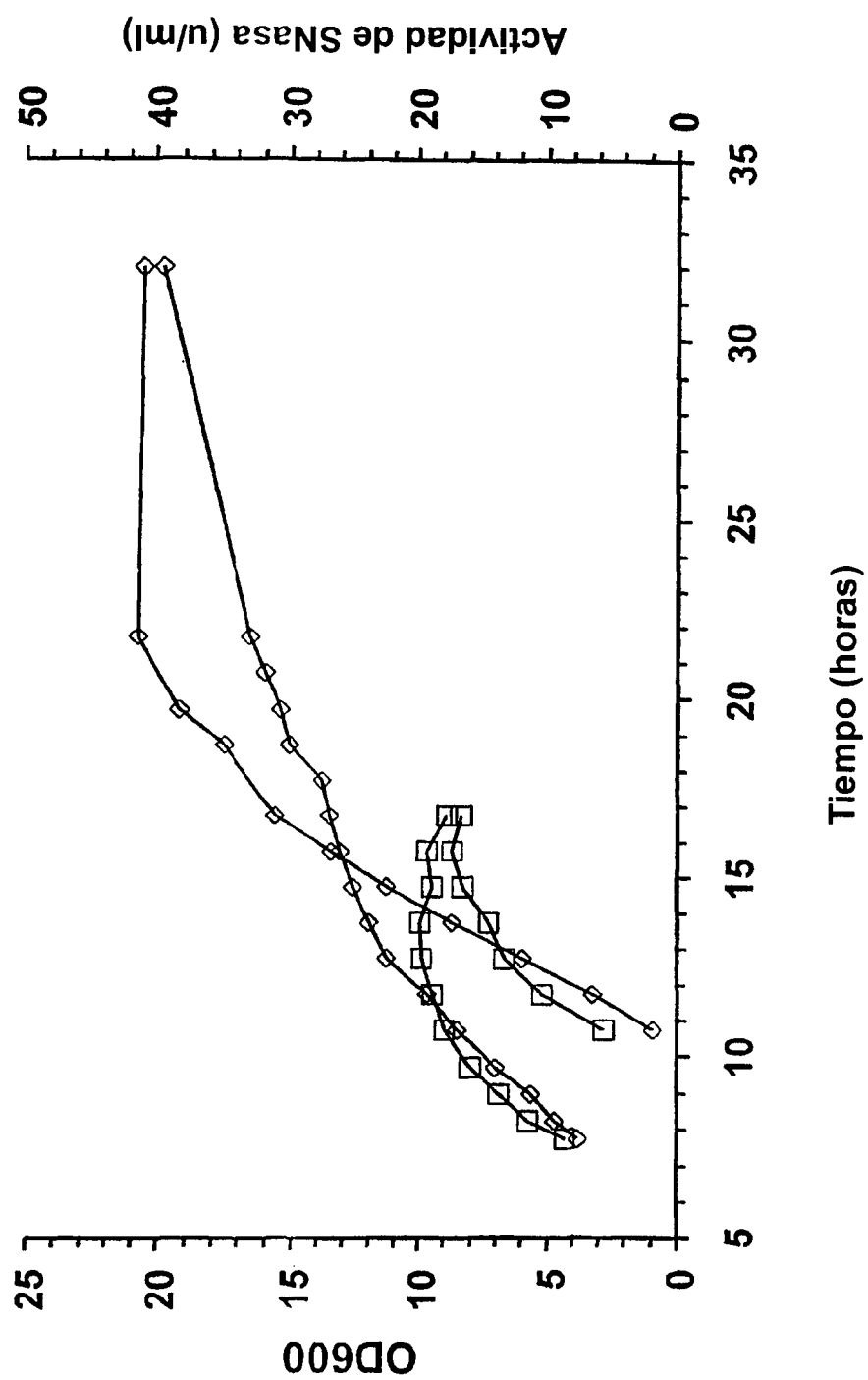


Fig. 12

Fig. 12

ES 2 336 647 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vrang, Astrid
Madsen, Soren
5 Bredmose, Lars
Ravn, Peter
Arnau, Jose
Johnsen, Mads
10 Steenberg, Anne
Israelsen, Hans

<120> MÉTODO MEJORADO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS GÉNICOS
15 HETEROLÓGOS EN BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO

<130> 54320.000007

<140> US 09/692,205
20 <141> 20/10/2000

<160> 9

25 <170> PatentIn versión 3.0

<210> 1
<211> 35
30 <212> PRT
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 1
35 Met Lys Phe Asn Lys Lys Arg Val Ala Ile Ala Thr Phe Ile Ala Leu
1 5 10 15
40 Ile Phe Val Ser Phe Phe Thr Ile Ser Ser Gln Asp Ala Gln Ala Ala
45 20 25 30
50 Glu Arg Ser
35

<210> 2
<211> 72
55 <212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*
<220>
<221> misc_feature
60 <223> cebador 1 de Usp

65

ES 2 336 647 T3

<400> 2

tagtaggatac cccgggtctag attagggtaa ctttgaaagg atattcctca tgaaaaaa
aa 60

5

gattatctca gc
72

10 <210> 3

<211> 40

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

15

<220>

<221> misc_feature

<223> cebador 2 de Usp

20

<400> 3

acgcgtcgac ctgcagagat cttgtgtcag cgtaaacc
40

25

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

<223> cebador Ter 1

35

<400> 4

tagtagtcga caaccgggtg ttgggag
27

40

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

45

<213> Artificial

<220>

50

<223> cebador de rrnctt Xhol

<400> 5

ggccgctcga gggcgcaaaa tagcgat
27

55

<210> 6

60

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

65

<220>

<223> cebador de pAK8Orev2

ES 2 336 647 T3

<400> 6
cccatttagc cgtcatttca g
21
5
<210> 7
<211> 57
<212> ADN
10 <213> Artificial
<220>
15 <223> cebador de LBEp041
<400> 7
gtcgacctgc agactagtga tatcagatct agccatgggg aatataccttt caaagtt
20 57
<210> 8
<211> 27
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> cebador de Nuc1
<400> 8
ggaagatctt cacaaacaga taacggc
35 27
40 <210> 9
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial
45 <220>
<223> cebador de Nuc2
50 <400> 9
acgcgtcgac gaattcgatc taaaaattat aaaagtgcc
55 39
60
65