

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 443**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2005 E 05733219 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **13.12.2006 EP 1730313**

54 Título: **Mejora del rendimiento en la expresión de proteínas en sistemas de síntesis de proteínas en ausencia de células mediante la adición de agentes antiespumantes**

30 Prioridad:

25.03.2004 US 556736 P

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

31.01.2013

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY LICENSING 1705 EL
CAMINO REAL
PALO ALTO, CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:

**VOLOSHIN, ALEXEI, M. y
SWARTZ, JAMES ROBERT, DEPT OF CHEMICAL
ENGINEERING**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 394 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mejora del rendimiento en la expresión de proteínas en sistemas de síntesis de proteínas en ausencia de células mediante la adición de agentes antiespumantes

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La síntesis de proteínas es un proceso biológico fundamental, que subyace en el desarrollo de polipéptidos terapéuticos, diagnósticos y catalizadores. Con la llegada de la tecnología del ADN recombinante (ADNr) se ha conseguido aprovechar la maquinaria catalítica de la célula para producir una proteína deseada. Esto se puede conseguir dentro del entorno celular o *in vitro* utilizando extractos procedentes de células.

[0002] A lo largo de la década pasada, la productividad de sistemas en ausencia de células se ha mejorado en dos órdenes de magnitud, desde 5 µg/ml·h aproximadamente a 500 µg/ml·h aproximadamente. Este logro ha convertido la síntesis de proteínas *in vitro* en una técnica práctica para la investigación a escala de laboratorio y proporciona una plataforma tecnológica para la expresión de alto rendimiento de proteínas. También comienza a apuntar la posibilidad de uso de tecnologías en ausencia de células como alternativa a la producción *in vivo* a gran escala de compuestos farmacéuticos proteicos.

[0003] La síntesis de proteínas en ausencia de células ofrece numerosas ventajas sobre los procedimientos convencionales de expresión de proteínas *in vivo*. Los sistemas en ausencia de células pueden dirigir la mayor parte de, sino todos, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Además, la ausencia de pared celular *in vitro* es una ventaja puesto que permite un mejor control del entorno de síntesis. Por ejemplo, los niveles de ARNt pueden variar para reflejar la utilización codónica de los genes expresados. Además, se puede alterar el potencial redox, el pH, o la fuerza iónica con una mayor flexibilidad que *in vivo* puesto que el crecimiento o la viabilidad celular no suponen una preocupación. Por otra parte, se puede conseguir fácilmente la recuperación directa de los productos proteicos purificados y convenientemente plegados.

[0004] La traducción *in vitro* también tiene reconocimiento por su capacidad para incorporar aminoácidos no naturales y marcados isotópicamente así como por su capacidad para producir proteínas que son inestables, insolubles o citotóxicas *in vivo*. Además, la síntesis de proteínas en ausencia de células puede desempeñar un papel revolucionario en tecnologías de ingeniería de proteínas y de selección proteómica. El procedimiento en ausencia de células circunda los procesos laboriosos necesarios para la clonación y transformación de células para la expresión de nuevos productos génicos *in vivo*, y se está convirtiendo en una plataforma tecnológica para este campo.

[0005] A pesar de todas las características prometedoras de la síntesis de proteínas en ausencia de células, su utilización práctica e implementación a gran escala ha estado limitada por diversos obstáculos. Preponderantes entre estos obstáculos se encuentran los cortos periodos de reacción y las bajas tasas de producción de proteínas, que dan lugar a malos rendimientos en la síntesis de proteínas y un coste en reactivos elevado. El trabajo pionero de Spirin y col. (1988) Science 242: 1162 – 1164 sorteó inicialmente el problema de los cortos periodos de reacción con el desarrollo de un sistema de flujo continuo. Muchos laboratorios han duplicado y mejorado este trabajo, pero todos ellos han utilizado principalmente procedimientos que suministran sustratos de manera constante a la cámara de reacción. Este enfoque incrementa la duración de la reacción de traducción y el rendimiento proteico en comparación con el sistema discontinuo. No obstante, es ineficiente por su utilización de reactivos caros, generalmente produce un producto diluido, y no ha proporcionado mejoras significativas en las tasas de producción.

[0006] El sistema discontinuo convencional ofrece diversas ventajas sobre estos esquemas continuos y semi-continuos, que incluye una fácil escalabilidad, reproducibilidad, mejores tasas de producción de proteínas, conveniencia, aplicabilidad para formatos multiplexados para la expresión de alto rendimiento, y un uso del sustrato más eficiente. Estas ventajas hacen que la mejora de la productividad del sistema discontinuo sea crucial para la utilización industrial de síntesis de proteínas en ausencia de células. No obstante, utilizando la metodología actual, se produce una pérdida de eficiencia cuando las reacciones se llevan a cabo a mayor escala. La reducción en el rendimiento de productos proteicos específicos es especialmente grave en sistemas que requieren oxígeno para la fosforilación oxidativa. El incremento del rendimiento del producto en reacciones más grandes es un componente esencial para satisfacer esta necesidad.

Bibliografía relevante

[0007] Patente de EE.UU 6.337.191 B1, Swartz y col. Kim y Swartz (2000) Biotechnol Prog. 16: 385 – 390; Kim y Swartz (2000) Biotechnol Lett. 22: 1537 – 1542; Kim y Choi (2000) J Biotechnol. 84: 27 – 32; Kim y col. (1996) Eur J Biochem. 239: 881 – 886; Tao y Levy (1993) Nature 362: 755 – 758; Hakim y col. (1996) J Immun. 157: 5503 – 5511; Pratt (1984) Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. In: Hames BD, Higgins SJ. Ed. In transcription and translation: a practical approach. Nueva York: IRL press: 179 – 209.; Davanloo y col. (1984) PNAS 81: 2035 – 2039; Cock y col. (1999) Biochemistry 259: 96 – 103; Gill y Hippel (1989) Anal. Biochem. 182: 319 – 326; Kim y col. (1999) Europ. J. Biochem. 239: 881 – 886; Davanloo y col. (1984) PNAS 81: 2035 – 2039.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] Las composiciones y procedimientos se proporcionan para la síntesis *in vitro* de moléculas biológicas en mezclas de reacción que comprenden agentes antiespumantes. La adición de agentes antiespumantes a las reacciones de síntesis en ausencia de células mejora el rendimiento específico de las proteínas en sistemas en ausencia de células. En una forma de realización de la invención, la mezcla de reacción que comprende un agente antiespumante es una reacción a mayor escala, por ejemplo, a volúmenes de reacción superiores a, al menos, 15 µl aproximadamente. Las reacciones se pueden llevar a cabo en diversos reactores, como es bien sabido en la técnica, que incluyen reactores de columna de burbujeo.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0009] La Figura 1 es una gráfica que representa el rendimiento proteico en reacciones que comprenden diferentes agentes antiespumantes.

[0010] La Figura 2 es un esquema de un reactor de burbujeo.

[0011] La Figura 3 es una gráfica que representa los rendimientos de la proteína GMCSF-scFv en una columna de burbujeo con volúmenes de reacción totales de 1500 µl, en comparación con una reacción de 15 µl.

[0012] La Figura 4 es una gráfica que representa los rendimientos en una columna de burbujeo con un volumen de reacción de 2000 µl, en comparación con la reacción en una película delgada de 200 µl, y una reacción en un tubo Eppendorf de 15 µl. Con la adición de un antiespumante, el rendimiento específico en cada sistema es comparable.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACION

[0013] Se proveen composiciones como se define en la reivindicación 12 y procedimientos como se define en la reivindicación 1 para la síntesis *in vitro* de moléculas biológicas en mezclas de reacción que comprenden agentes antiespumantes para mejorar el rendimiento total, soluble, y activo de proteínas sintetizadas en sistemas en ausencia de células. La adición de antiespumante puede incrementar el rendimiento en reacciones a pequeña escala, pero es particularmente beneficiosa en reacciones a mayor escala, especialmente en reactores que proporcionan condiciones aeróbicas.

[0014] La síntesis *in vitro*, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la síntesis en ausencia de células de macromoléculas biológicas en una mezcla de reacción que comprende extractos biológicos y/o reactivos definidos. La mezcla de reacción comprenderá un molde para la producción de la macromolécula, por ejemplo, ADN, ARNm, etc.; monómeros para la síntesis de la macromolécula, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc., y cofactores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores de transcripción, etc. Dichos sistemas de reacción sintéticos son muy conocidos en la materia, y han sido descritos en la bibliografía. En los procedimientos de la invención se pueden utilizar una serie de químicas de reacción para la síntesis de polipéptidos. Por ejemplo, se describen químicas de reacción en la patente de EE.UU. N° 6.337.191, expedida el 8 de enero de 2002, y en la patente de EE.UU. N° 6.168.931, expedida el 2 de enero de 2001.

[0015] En una forma de realización de la invención, la química de reacción es como se describe en la solicitud de patente pendiente de tramitación US 10/643.683. La fosforilación oxidativa está activada, proporcionando mayores rendimientos y una mejor utilización de las fuentes de energía. Se obtienen mejores rendimientos mediante una combinación de factores, incluyendo la utilización de extractos biológicos procedentes de bacterias crecidas en un medio que contiene glucosa; ausencia de polietilenglicol; y una concentración optimizada de magnesio. Esto proporciona un sistema homeostático, en el que se puede producir la síntesis incluso en ausencia de fuentes de energía secundarias.

[0016] Es bien sabido en la materia que el comportamiento de los biorreactores puede variar drásticamente con la escala. Existen dificultades a la hora de mantener la homogeneidad en sistemas grandes, cambios en las relaciones de superficie a volumen, y cambios en las propias reacciones debido a marcos temporales ampliados. Además de estos problemas, las reacciones de síntesis de proteínas *in vitro* que activan la fosforilación oxidativa pueden requerir mayor cantidad de oxígeno para un rendimiento óptimo, cuyo suministro se vuelve más difícil a medida que se incrementa el volumen de reacción.

[0017] Entre los tipos de reactores más habituales se incluyen, sin limitación, reactores de tanque agitado; los reactores de columna de burbujeo y los reactores de levantamiento por aire, que se basan en la inyección de gas para su agitación; etc. Se puede preferir el reactor de columna de burbujeo para las condiciones de reacción de Cytomim.

[0018] Un problema encontrado habitualmente en la fermentación comercial es el de la espumación, que no es deseable por diversas razones, incluyendo el posibilitar una vía de entrada de células contaminantes al fermentador.

La espuma en cultivos celulares se ha controlado con la adición de agentes químicos de superficie activa, a pesar de que dichos agentes antiespumantes normalmente reducen los valores de K_{La} , disminuyendo la capacidad del reactor para suministrar oxígeno y otros gases, y también pueden inhibir el crecimiento celular. Para la síntesis *in vitro*, cabría esperar que los componentes hidrófobos del antiespumante interfirieran con la síntesis y el tratamiento de las proteínas, puesto que los catalizadores y los productos emergentes no están protegidos dentro de una célula como cuando las proteínas se expresan *in vivo*, por ejemplo, mediante procedimientos de expresión recombinante convencionales. Los resultados proporcionados en el presente documento son, por tanto, inesperados.

AGENTES ANTIESPUMANTES

10

[0019] Las reacciones de síntesis de proteínas *in vitro* de la presente invención comprenden un agente antiespumante diferente de un detergente en donde el agente antiespumante se selecciona entre copolímeros en bloque, glicoléteres de alquilpolioxialquileño; polímeros de siloxano y mezclas de dispersiones de poliéter basadas en polipropileno orgánico no siliconado. El agente está presente a una concentración de al menos el 0,0007 % aproximadamente, y puede ser de al menos el 0,0001 % aproximadamente, y no superior al 0,001 % aproximadamente, y habitualmente no superior al 0,007 % en peso aproximadamente. Se pueden emplear diferentes estrategias de control, incluyendo una alícuota fijada, control bajo demanda, y control proporcional, integral, y/o derivado o una combinación de los mismos, para ajustar la velocidad de flujo del agente antiespumante en reacciones con alimentación continua. Las cantidades óptimas de las adicciones de agente antiespumante dependen de variables tales como las condiciones de reacción, el tipo de agente antiespumante, y similares. Las cantidades óptimas añadidas de agente antiespumante; y cuando sea aplicable del lapso de tiempo entre adicciones, se pueden determinar empíricamente durante ensayos de prueba.

[0020] Agente antiespumante, como se utiliza en el presente documento, es un compuesto químico de superficie activa añadido a la mezcla de reacción para facilitar la rotura de burbujas y la liberación de gas y para contrarrestar la espumación que puede estar causada por la mezcla, inyección, o agitación. Los agentes antiespumantes pueden evitar, eliminar, y/o reducir la producción de espuma. Además, los agentes antiespumantes pueden conferir propiedades superficiales auxiliares positivas, tales como humectación, dispersión, emulsificación, solubilización, flujo y nivelación, adhesión, y brillo.

30

[0021] Otros ejemplos de agentes antiespumantes incluyen ésteres, alcoholes, siliconas, sulfitos, sulfonatos, ácidos grasos y sus derivados, etc. Se conocen y están disponibles comercialmente una amplia variedad de dichos agentes, por ejemplo, a través de Sigma Chemicals; J.T., Baker; etc. En la invención, el agente antiespumante es diferente de un detergente.

35

[0022] Los copolímeros en bloque proveen una actividad desespumante / antiespumante formando una monocapa insoluble en la interfaz aire / agua de la espuma. La actividad desespumante de un copolímero en bloque es una función tanto del punto de turbidez del copolímero como de la temperatura de utilización. Para seleccionar un desespumante eficaz, se selecciona un copolímero en bloque cuyo punto de turbidez sea inferior a la temperatura de utilización prevista. Los copolímeros en bloque con un bajo contenido en óxido de etileno son los desespumantes más eficaces. Los tensioactivos PLURONIC® son ampliamente utilizados como desespumantes. Los tensioactivos de estructura inversa PLURONIC® R también son eficaces en aplicaciones desespumantes. Otros agentes antiespumantes de interés incluyen polímeros de siloxano, mezclas de dispersiones de poliéter basadas en polipropileno orgánico no siliconado; antiespumantes orgánicas de tipo éster de ácido graso, y similares.

45

QUÍMICA DE REACCIÓN

[0023] El molde para la síntesis de proteínas en ausencia de células puede ser ARNm o ADN. La traducción de ARNm o la transcripción y traducción combinadas convierten la información almacenada en una proteína. El sistema combinado, en general utilizado en sistemas de *E. coli*, genera ARNm de manera continua a partir de un molde de ADN con un promotor reconocible. Se utiliza ARN polimerasa endógena, o se añade directamente a la mezcla de reacción una ARN polimerasa de fago exógena, normalmente T7 o SP6. Alternativamente el ARNm se puede amplificar de manera continua insertando el mensaje en un molde para la replicasa QB, un ARN que depende de la ARN polimerasa. El ARNm purificado generalmente se estabiliza mediante modificación química antes de añadirlo a la mezcla de reacción. Las nucleasas se pueden extraer de los extractos para ayudar a estabilizar los niveles de ARNm. El molde puede codificar para cualquier gen de interés particular.

[0024] También se pueden añadir otras sales, particularmente aquellas que sean biológicamente pertinentes, tales como sales de manganeso. Las sales de potasio en general se añaden a una concentración comprendida entre 50 – 250 mM y las de amonio entre 0 – 100 mM. El pH de la reacción generalmente se encuentra a pH 6 – 9. La temperatura de la reacción generalmente está entre 20 °C y 40 °C. Estos intervalos se pueden ampliar.

[0025] Se pueden añadir a la mezcla de reacción inhibidores metabólicos contra actividades enzimáticas no deseadas. Alternativamente, las enzimas o factores que sean responsables de actividades no deseadas se pueden extraer directamente del extracto. En tercer lugar, el gen que codifica la enzima no deseada se puede inactivar o eliminar del cromosoma.

[0026] También se pueden añadir vesículas al sistema, purificadas a partir del organismo hospedador o sintetizadas. Éstas se pueden utilizar para mejorar la síntesis y el plegamiento de las proteínas. Se ha demostrado que esta tecnología Cytomim activa procesos que utilizan vesículas de membrana que contienen componentes de la

5 cadena respiratoria para la activación de la fosforilación oxidativa. Los presentes procedimientos se pueden utilizar para que la expresión en ausencia de células active otros grupos de proteínas de membrana.

[0027] Los sistemas sintéticos de interés incluyen la replicación del ADN, que puede incluir la amplificación de ADN, la transcripción de ARN a partir de moldes de ADN o ARN, la traducción de ARN en polipéptidos, y la síntesis

10 de carbohidratos complejos a partir de azúcares simples.

[0028] Las reacciones se pueden realizar a gran escala, a pequeña escala, o se pueden multiplexar para realizar varias síntesis simultáneas. Se pueden introducir reactivos adicionales para prolongar el periodo de tiempo de la síntesis activa. El producto sintetizado normalmente se acumula en el reactor, y a continuación se aísla y se purifica

15 de acuerdo con los procedimientos habituales para la purificación de proteínas después de la compleción operativa del sistema.

[0029] Es de particular interés la traducción de ARNm para producir proteínas, cuya traducción se puede acoplar a la síntesis *in vitro* de ARNm a partir de un molde de ADN. Dicho sistema en ausencia de células contendrá todos los

20 factores necesarios para la traducción del ARNm, por ejemplo, ribosomas, aminoácidos, ARNt, aminoacil sintetetas, factores de elongación y factores de iniciación. Los sistemas en ausencia de células conocidos en la materia incluyen extractos de *E. coli*, etc., que se pueden tratar con una nucleasa adecuada para eliminar el ARNm endógeno activo.

[0030] Además de los componentes anteriores se pueden añadir a la reacción materiales específicamente necesarios para la síntesis de proteínas tales como extractos exentos de células, moldes genéticos, y aminoácidos. Estos materiales incluyen sales, compuestos poliméricos, AMP cíclico, inhibidores de enzimas que degradan las

25 proteínas o los ácidos nucleicos, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, reguladores de la oxidación / reducción, tensioactivos no desnaturizantes, componentes tamponantes, espermina, espermidina, etc.

[0031] Las sales incluyen preferentemente sales de potasio, magnesio, amonio y manganeso del ácido acético o el ácido sulfúrico, y algunas de éstas pueden presentar aminoácidos como contraiones. Los compuestos poliméricos pueden ser polietilenglicol, dextrano, dietil aminoetil dextrano, aminoetil cuaternario y aminoetil dextrano, etc. El

30 regulador de la oxidación / reducción puede ser ditiotreitól, ácido ascórbico, glutatión y/o sus óxidos. Además, se puede usar un tensioactivo no desnaturizante tal como Triton X-100 a una concentración de 0 – 0,5 M. La espermina y espermidina se pueden utilizar para mejorar la capacidad sintética de las proteínas, y el AMPc se puede utilizar como regulador de la expresión génica.

[0032] Cuando se varía la concentración de un componente particular del medio de reacción, puede cambiar de

40 manera análoga la concentración de otro componente. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes tales como compuestos nucleótidos y fuentes de energía se pueden controlar de manera simultánea de acuerdo con la variación de las concentraciones de otros componentes. Además, los niveles de concentración de los componentes del reactor se pueden variar a lo largo del tiempo.

[0033] Preferentemente, la reacción se mantiene en el intervalo de pH 5 – 10 y a una temperatura de 20 – 50 °C, y

45 más preferentemente en el intervalo de pH 6 – 9 y una temperatura de 25 – 40 °C.

[0034] La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción se puede medir de diversas maneras. Un procedimiento se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular a traducir.

50 Ejemplos de ensayos para medir la actividad proteica son un sistema de ensayo luciferasa, y un sistema de ensayo cloranfenicol acetiltransferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida en la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán aquellas proteínas de longitud completa que sean inactivas debido a un plegamiento incorrecto de la proteína o a la falta de otras modificaciones post-traduccionales necesarias para la actividad de la proteína.

[0035] Otro procedimiento para medir la cantidad de proteína producida en reacciones combinadas de transcripción y traducción *in vitro* es llevar a cabo las reacciones utilizando una cantidad conocida de aminoácidos

55 radiomarcados tales como ³⁵S-metionina o ¹⁴C-leucina y medir posteriormente la cantidad de aminoácido radiomarcado incorporado a la proteína recién traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro*, incluyendo

60 productos proteicos truncados. La proteína radiomarcada se puede separar posteriormente en un gel de proteínas, y mediante autorradiografía se puede confirmar que el producto tiene el tamaño adecuado y que no se han producido productos proteicos secundarios.

VOLÚMENES Y GEOMETRÍAS DE REACCIÓN

[0036] A pesar de que las reacciones pueden ser de cualquier volumen, los procedimientos son particularmente ventajosos en una reacción a mayor escala, en donde el volumen de reacción es de al menos 15 μ l aproximadamente, normalmente de al menos 50 μ l aproximadamente, más habitualmente de al menos 100 μ l aproximadamente, y que puede ser de 500 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l, o superior. En muchos casos, las reacciones individuales no serán superiores a 10 ml aproximadamente, aunque se pueden correr en paralelo varias reacciones. No obstante, también se anticipa que la presente invención permitirá el escalado a volúmenes mucho mayores, como los utilizados en biorreactores comerciales, que se pueden configurar para volúmenes de 1 l, 10 l, 100 l, 1000 l, o superior. Aunque la mezcla de reacción puede comprender líquidos, por ejemplo, vesículas invertidas, normalmente no está unida a la superficie mediante bicapas lipídicas.

[0037] Como se usa en el presente documento, el término "a pequeña escala" se refiere a reacciones que tienen un volumen aproximado de, o inferior a, 15 μ l aproximadamente. Los procedimientos de la presente invención permiten reacciones " / a mayor escala", como se ha descrito anteriormente, para mantener rendimientos sustancialmente consistentes en comparación con una reacción a pequeña escala. El rendimiento se puede calcular mediante cualquier procedimiento conveniente, mientras se aplique de manera consistente entre las diferentes reacciones, por ejemplo, síntesis de proteínas totales/ml de la mezcla de reacción; síntesis de proteínas solubles/ml de la mezcla de reacción; síntesis de proteínas biológicamente activas/ml de la mezcla de reacción; y similares. El rendimiento en una reacción a mayor escala, en comparación con una reacción a pequeña escala equivalente (es decir, una reacción que comprende los mismos reactivos, y que sólo difiere en el volumen), normalmente es de al menos el 90 % aproximadamente, más habitualmente de al menos el 95 % aproximadamente, y puede ser de al menos el 99 % aproximadamente. En algunos casos se ha observado que el rendimiento de hecho se incrementa en una mezcla de reacción a mayor escala de la presente invención.

[0038] El sistema puede funcionar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, preferentemente aeróbicas. Para evitar la desecación de la reacción, el espacio de cabeza puede estar humidificado, normalmente saturado en al menos el 80 % aproximadamente a la temperatura de trabajo, más habitualmente saturado en al menos el 90 % aproximadamente a la temperatura de trabajo. En las condiciones de laboratorio normalmente es suficiente para sellar la cámara que encierra el espacio de cabeza. El espacio de cabeza de la cámara de reacción se puede rellenar con oxígeno o se puede infundir oxígeno en la mezcla de reacción. El oxígeno se puede suministrar de manera continua o el espacio de cabeza de la cámara de reacción se puede rellenar durante el transcurso de la expresión de proteínas durante tiempos de reacción más prolongados. Aparte del oxígeno, también se pueden suministrar otros aceptores de electrones, tales como nitrato, para extraer las células previamente inducidas por la vía de respiración adecuada.

[0039] Se pueden proporcionar condiciones de reacción aireadas en un diseño de columna de burbujeo. En una columna de burbujeo, el aire se burbujea o se inyecta en el contenedor relleno del líquido. El gas se puede dispersar en burbujas mediante la inyección del gas en la fase líquida, como en una columna. El gas, por ejemplo oxígeno o una mezcla que comprende oxígeno, se puede dispersar en burbujas mediante placas de distribución que cubren el área total de la columna, y también con reactores de levantamiento por aire, en los que el aire se confina en un canal por medio de un bucle o un tubo de aspiración diseñado para conferir un cierto tipo de patrón circulatorio global a todo el tanque. En la materia se conocen una serie de configuraciones de columna, y pueden incluir variaciones en el tamaño, los deflectores, el espacio de cabeza, etc. Por ejemplo, véase Bubble Column Reactions, 1st ed.; Wolf-Dieter Deckwer (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Alemania) ISBN: 0471918113; Oldshue (1983) Biotechnol Adv. 1(1): 17 – 30; Poulsen & Iversen (1999) Biotechnol Bioeng. 64(4): 452 – 8; Poulsen & Iversen (1998) Biotechnol Bioeng. 58(6): 633 – 41; entre otros.

[0040] Se debe entender que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones, y reactivos particulares descritos, puesto que naturalmente éstos se pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene como único fin describir formas de realización particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que sólo estará limitada por las reivindicaciones anexas.

[0041] A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que pueda entender normalmente alguien con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. A pesar de que en la práctica o puesta a prueba de la invención se puede utilizar cualquier procedimiento, dispositivo o material similar equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.

[0042] Las publicaciones descritas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de expedición de la presente solicitud. Nada en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha descripción en virtud de la invención previa.

[0043] Los siguientes ejemplos se exponen para así proporcionar a aquellos con conocimientos ordinarios en la

materia una divulgación y descripción completas de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que se considera la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión de los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero deben concederse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es a presión atmosférica o próxima a ésta.

PARTE EXPERIMENTAL

10 Ejemplo 1

- [0044]** Se probó la adición de agentes antiespumantes a un sistema de síntesis de proteínas en ausencia de células. Se añadieron cinco agentes antiespumantes diferentes al sistema en ausencia de células PANOX (Kim y Swartz 2001 Biotechnol. Bioengineer. 74: 309 – 316) y se encontró que mejora el rendimiento total, soluble, y activo de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de *E. coli* (Figura 1). La Figura 2 muestra el esquema básico del reactor de burbujeo. Las Figuras 3 y 4 comparan el rendimiento de la construcción de la proteína de mamífero GMCSF-VL-VH y la CAT en el reactor de burbujeo a gran escala frente a pequeña escala en tubos Eppendorf. Los agentes se enumeran en la Tabla 1, y los componentes de reacción en las Tablas 2 y 3.
- [0045]** Para el sistema Cytomim, los componentes listados en la Tabla 2 se mezclan a las concentraciones indicadas (Jewett y Swartz, solicitud pendiente de tramitación 10/643.683). Para el sistema PANOX, los componentes listados en la Tabla 3 se mezclan a las concentraciones indicadas como se describe por Swartz y Kim, "Regeneration of Adenosine Triphosphate from Glycolytic Intermediates for Cell-Free Protein Synthesis", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 74, 4, 20 de agosto de 2001.
- [0046]** Para la expresión de la proteína CAT, el ADN utilizado como molde en el sistema es el plásmido circular pK7-CAT que incluye el promotor T7 seguido por el gen que codifica la proteína Cloranfenicol Acetil Transferasa de *E. coli*. El gen estructural se encuentra seguido de un terminador T7.
- [0047]** Para la expresión de la proteína GMCSF-scFv, el ADN utilizado como molde en el sistema es el plásmido circular pK7-GMCSF-VL-VH que incluye el promotor T7 seguido por el gen que codifica la proteína GMCSF (Mi-Hua Tao, 1993) y fusionado al gen que codifica el fragmento scFv del anticuerpo de linfoma murino, 38C13 (Hakim, 1996) a través de un enlazador de 5 aminoácidos (glicina₄-serina). El gen estructural se encuentra seguido de un terminador T7.
- [0048]** El extracto celular S30 se preparó a partir de *E. coli* K12 (cepa A19) de acuerdo con los procedimientos de Pratt (1984). No se añadió DL-ditiotreitol al lisado celular después de la homogeneización. Se preparó ARN polimerasa de T7 a partir del cultivo de la cepa BL21 de *E. coli* (pAR1219) según los procedimientos de Davanloo y col. (1984).
- [0049]** Para la expresión de GMCSF-VL-VH, el sistema de expresión se modificó para mejorar el plegamiento de las proteínas y la formación de puentes disulfuro utilizando las siguientes adiciones. El extracto exento de células se trató previamente con yodoacetamida 0,85 mM (IAM) durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de su adición a la mezcla de reacción. Se añadió *E. coli* DsbC a una concentración de 50 µg/ml. Se añadió glutatión oxidado y reducido a la mezcla de reacción a concentraciones de 4 mM y 1 mM, respectivamente.
- [0050]** Se preparó *E. coli* DsbC sobre-expresando la cepa BL21 (DE3) (pETDsbC) y se purificó con una columna IMAC de cobalto. Las fracciones seleccionadas se dializaron contra tampón S30 (Pratt, 1984) que contiene DTT 5 mM para reducir el sitio activo de DsbC.
- [0051]** Los agentes antiespumantes se adquirieron en los vendedores listados, y se añadieron en las cantidades indicadas. En algunos casos, el antiespumante se diluyó en agua para añadir 1 µl de mezcla antiespumante / agua a cada 15 µl de reacción en ausencia de células.
- [0052]** Para el procedimiento en un tubo de ensayo Eppendorf, la mezcla de volumen apropiado se pipeteó del fondo de un tubo de ensayo Eppendorf. El tubo se incubó a 37 °C durante el periodo de tiempo adecuado (3 horas para el PANOX, 6 horas para el sistema Cytomim).

Tabla 1**Nombre del Antiespumante Fabricante**

Antiespumante 204	Sigma
Antiespumante B	JT Baker
Antiespumante O-30	Sigma
Triton X-705	Sigma
Antiespumante SE-15	Sigma

Tabla 2

5

Composición del reactivo y concentraciones del sistema de síntesis de proteínas en ausencia de células Cytomim.

Reactivo	Concentración
Glutamato de magnesio	8 mM
Glutamato amónico	10 mM
Glutamato de potasio	130 mM
ATP	1,20 mM
GTP	0,86 mM
UTP	0,86 mM
CTP	0,86 mM
Ácido fólnico	34 µg/ml
ARNt	170,6 µg/ml
20 aminoácidos	2 mM
Cisteína	9 mM
Piruvato	30 mM
NAD	3,3 mM
CoA	2,7 mM
-Ácido oxálico	4 mM
Espermidina	1,5 mM
Putrescina	1 mM
ARN polimerasa de T7	0,10 mg/ml
Plásmido	0,0133 mg/ml
Extracto S30*	Volumen total de reacción 6/25

Tabla 3

Composición del reactivo y concentraciones del sistema de síntesis de proteínas en ausencia de células PANOX.

Reactivo	Concentración
Glutamato de magnesio	20 mM
Glutamato amónico	10 mM
Glutamato de potasio	170 mM
ATP	1,2 mM
GTP	0,86 mM
UTP	0,86 mM
CTP	0,86 mM
Ácido folínico	34 µg/ml
ARNt	170,6 µg/ml
20 aminoácidos	2,0 mM
Fosfoenolpiruvato	30 mM
NAD	0,33 mM
CoA	0,27 mM
Ácido oxálico	2,70 mM
Putrescina	1,00 mM
Espermidina	1,50 mM
ARN polimerasa de T7	0,1 mg/ml
Molde del plásmido	0,0133 mg/ml
Extracto S30*	3,6 µl/15 µl RXN

[0053] El reactor de columna de burbujeo consta de una columna con un diámetro interno de 1 cm y una altura de 5 cm. La mezcla de reacción en ausencia de células (Tablas 1 y 2) se pipeteó en el interior de la columna (Figura 2). El gas se burbujeó a través de un pequeño chorro (menos de 1 mm de diámetro) en el fondo de la columna desde un tanque de gas comprimido.

[0054] Para el sistema Cytomim (como se describe por Jewett y Swartz, solicitud pendiente de tramitación 10/643.683), se utilizó oxígeno gaseoso puro y la reacción duró un máximo de 4 horas a 37 °C. Para las reacciones de PANOX se utilizó gas argón y el tiempo de reacción fue de 3 horas a 37 °C. El tamaño de burbuja fue de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y la tasa de burbujeo fue de aproximadamente una burbuja / segundo. Sin la adición de antiespumante, la reacción de síntesis de proteínas en ausencia de células produce espuma inmediatamente en la parte superior del reactor. No se produce proteína. Tras la adición de antiespumante (Sigma 15 204, volumen de antiespumante / volumen de reacción 1/1000 – 1/10.000), la reacción de síntesis de proteínas prosigue con una espumación mínima de hasta 3,5 a 4 horas produciendo unos rendimientos de proteína comparables a los de las reacciones del tubo Eppendorf de 15 µl (véase Figura 3 y 4).

[0055] La cantidad de proteína sintetizada se estimó a partir de las reactividades medidas del precipitado con TCA en un contador de centelleo de líquidos (LS3801, Beckman Coulter, Inc.). Después de centrifugar las muestras a 4 °C y a 15.000 RCF durante 15 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se utilizaron para determinar el rendimiento soluble mediante precipitación con TCA y recuento de centelleo. Los procedimientos se han descrito con detalle anteriormente (Kim y col., 1996 b).

[0056] Se muestran los resultados para la CAT así como para una proteína de fusión GM-CSF-scFv. Toda la reacción se realiza en modo discontinuo sin adiciones después del comienzo.

[0057] Estos datos demuestran que, a diferentes escalas y con geometrías y proteínas de reacción diferentes, la adición de un agente antiespumante proporciona una síntesis de proteínas *in vitro* mejorada. En particular, los

agentes antiespumantes proporcionan un rendimiento mejorado en una reacción a mayor escala utilizando una columna de burbujeo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la traducción *in vitro* de ARNm en ausencia de células para producir polipéptidos, el procedimiento que comprende la síntesis de dichos polipéptidos en una mezcla de reacción en
5 ausencia de células con un volumen superior a 15 µl, que comprende un agente antiespumante distinto de un detergente en una concentración de al menos el 0,00007 %, y no superior al 0,007 % en peso en donde el agente antiespumante se selecciona entre: copolímeros en bloque, que proporcionan una acción desespumante / antiespumante formando una monocapa insoluble en la interfaz del aire / agua de la espuma; glicoléteres de alquilpolioxialquileño; polímeros de siloxano; y mezclas de dispersiones de poliéter basadas en polipropileno
10 orgánico no siliconado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente antiespumante es un copolímero en bloque.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho copolímero en bloque es un tensioactivo PLURONIC™.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende un volumen superior a 100 µl aproximadamente.
20
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende un volumen superior a 1000 µl aproximadamente.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, en el que dicha mezcla de reacción
25 tiene un rendimiento que es de al menos el 90 % del rendimiento en una reacción comparable a pequeña escala.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, en el que se infunde oxígeno gaseoso en la mezcla de reacción en ausencia de células.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, en el que dicha síntesis se lleva a cabo en un reactor.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el reactor es un reactor de burbujeo.
- 35 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el procedimiento comprende adicionalmente la transcripción *in vitro* de ARNm a partir de un molde de ADN.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción comprende un extracto biológico; un molde para la producción del ARNm y/o el polipéptido; monómeros para el ARNm y/o el polipéptido a
40 sintetizar; y cofactores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis.
12. Una mezcla de reacción para la traducción *in vitro* de ARNm para producir polipéptidos, que comprende un extracto biológico; un molde para la producción del polipéptido; monómeros para el polipéptido a sintetizar; y cofactores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis; y un agente antiespumante
45 distinto de un detergente a una concentración de al menos el 0,00007 %, y no superior al 0,007 % en peso en la que el agente antiespumante se selecciona entre: copolímeros en bloque, que proporcionan una acción desespumante / antiespumante formando una monocapa insoluble en la interfaz del aire / agua de la espuma; glicoléteres de alquilpolioxialquileño; polímeros de siloxano; y mezclas de dispersiones de poliéter basadas en polipropileno orgánico no siliconado.
50
13. La mezcla de reacción de la reivindicación 12, en la que el agente antiespumante es un copolímero en bloque.
14. La mezcla de reacción de la reivindicación 13, en la que dicho copolímero en bloque es un
55 tensioactivo PLURONIC™.
15. La mezcla de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 que comprende adicionalmente un molde de ADN, monómeros, enzimas y reactivos para la producción del ARNm.

Figura 1

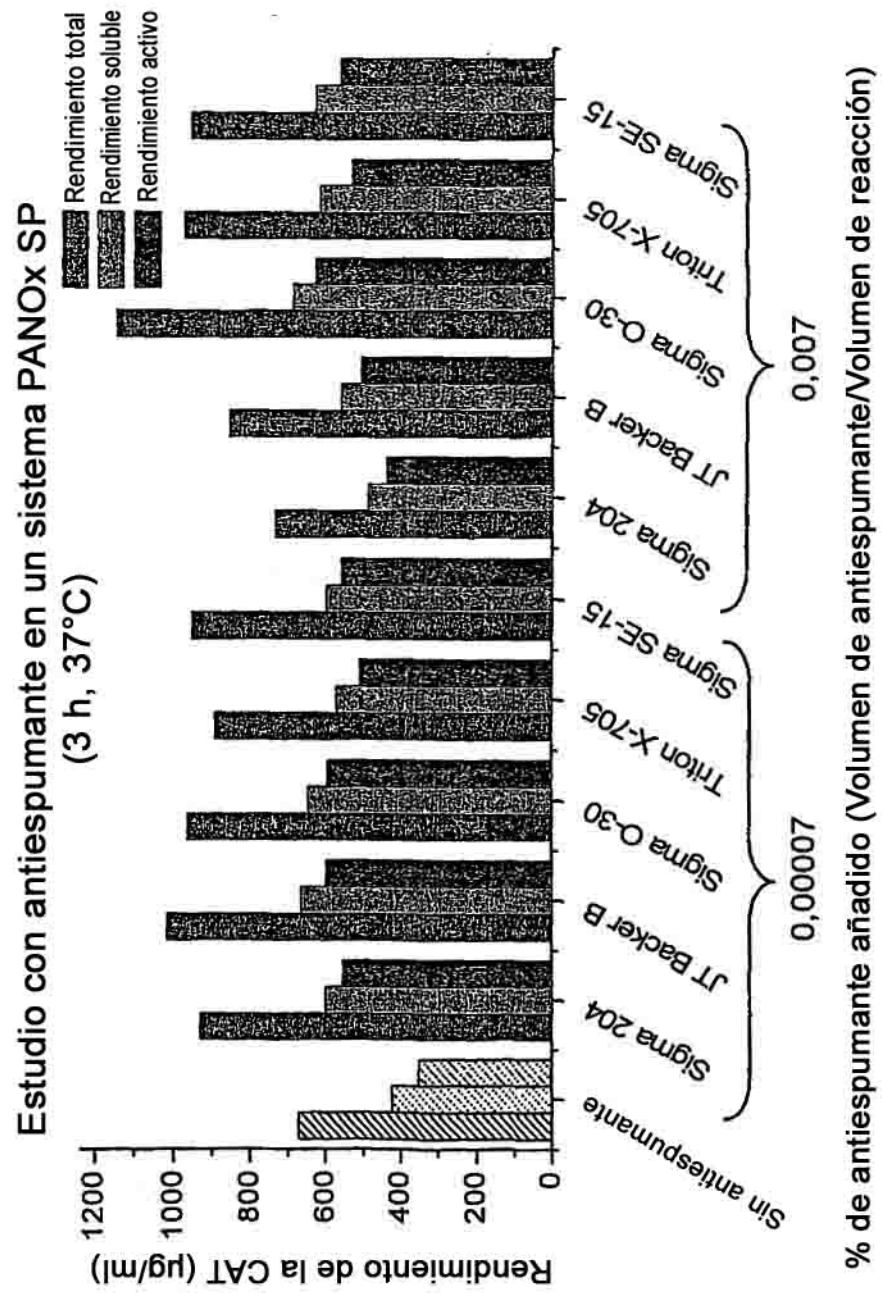


Figura 2

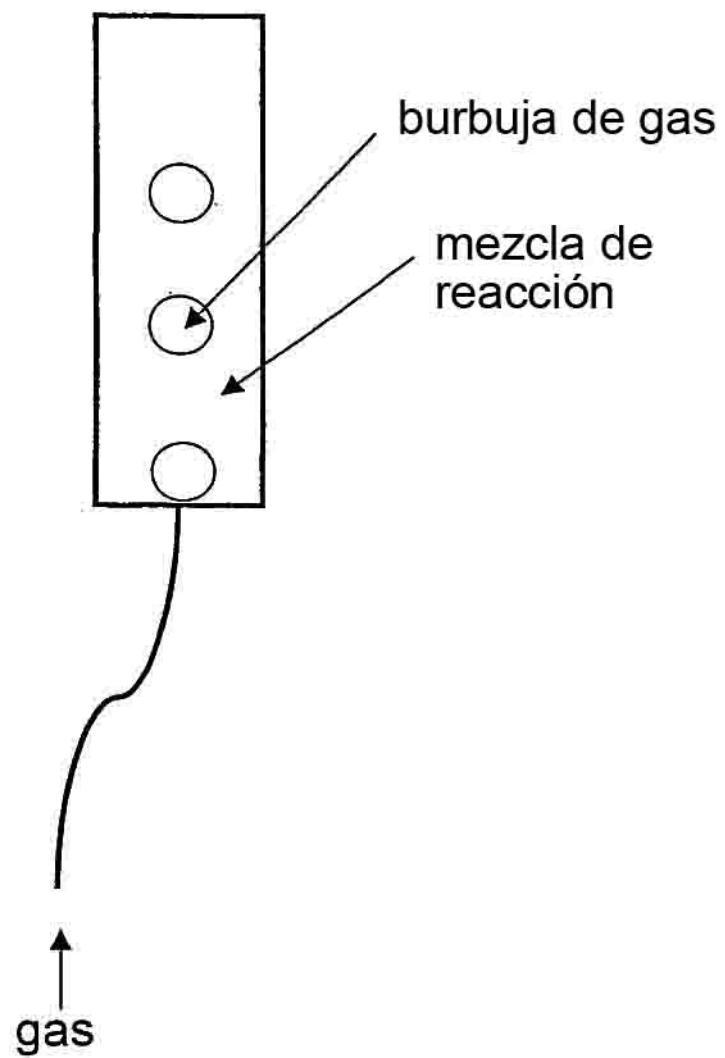


Figura 3

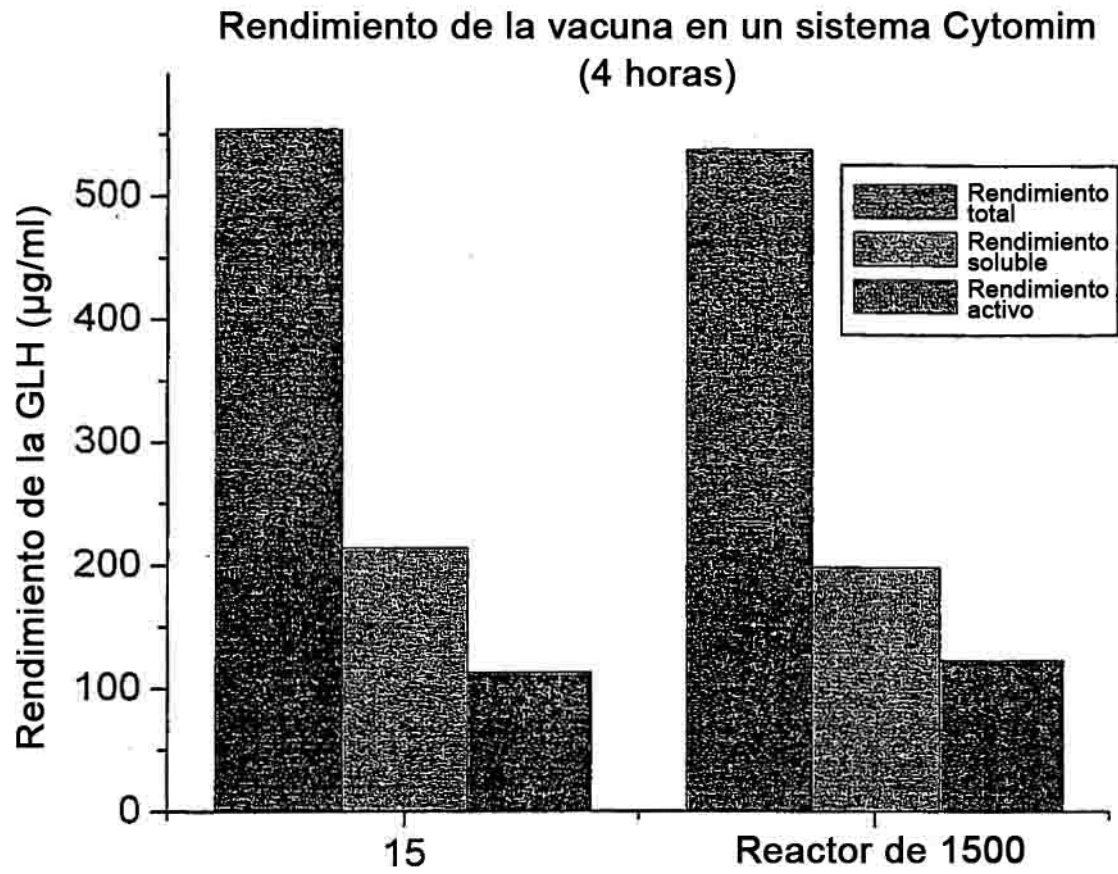


Figura 4