

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 635**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2007** **E 07870711 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 2035554**

54 Título: **Síntesis acelular de proteínas que contienen aminoácidos no naturales**

30 Prioridad:

29.06.2006 US 817772 P

29.06.2006 US 817915 P

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

26.07.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOERKE, AARON R. y
SWARTZ, JAMES ROBERT**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 415 635 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

Síntesis acelular de proteínas que contienen aminoácidos no naturales.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La síntesis de proteínas es un proceso biológico fundamental que sirve de base al desarrollo de productos terapéuticos polipeptídicos, vacunas, procedimientos de diagnóstico y enzimas industriales. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante (ADNr), se ha hecho posible el aprovechamiento de la maquinaria catalítica de la célula para producir una proteína deseada. Esto puede conseguirse dentro del entorno celular o *in vitro*, mediante extractos derivados de células.

[0002] La síntesis acelular de proteínas ofrece varias ventajas sobre los procedimientos de expresión de proteínas *in vivo*. Los sistemas acelulares pueden dirigir la mayor parte, si no todos, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Además, la falta de una pared celular *in vitro* es ventajosa porque permite el control del entorno de síntesis. Por ejemplo, es posible variar las concentraciones de ARNt para reflejar el uso de codones de los genes que se expresan. El potencial redox, el pH o la fuerza iónica pueden alterarse también con mayor flexibilidad que *in vivo*, porque no ha de tenerse en cuenta el crecimiento celular o la viabilidad. Además, puede llevarse a cabo fácilmente la recuperación directa de los productos proteínicos purificados y correctamente plegados.

[0003] La traducción *in vitro* también se reconoce por su capacidad para incorporar aminoácidos no naturales y marcados con isótopos, así como por su capacidad para producir proteínas que son inestables, insolubles o citotóxicas *in vivo*. Además, la síntesis acelular de proteínas puede desempeñar un papel en la revolución de las tecnologías de ingeniería de proteínas y análisis proteómico. El procedimiento acelular evita los laboriosos procedimientos requeridos para la clonación y la transformación celular para la expresión de nuevos productos génicos *in vivo* y está convirtiéndose en una tecnología de plataforma para este campo.

Bibliografía pertinente

30

[0004] Patente de los EE. UU. n°7.045.337, concedida el 16 de mayo de 2006.

[0005] Patente de los EE. UU. n°6.337.191 B1; Swartz y col., solicitud publicada de patente de los EE. UU. 20040209321; Swartz y col., solicitud publicada internacional WO 2004/016778; Swartz y col., solicitud publicada de patente de los EE. UU. 2005-0054032-A1; Swartz y col., solicitud publicada de patente de los EE. UU. 2005-0054044-A1; Swartz y col., solicitud publicada internacional WO 2005/052117. Calhoun y Swartz (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 90(5): 606-13; Jewett y Swartz (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 86(1): 19-26; Jewett y col. (2002) *Prokaryotic Systems for In Vitro Expression*, en: Weiner M., Lu Q., editores, *Gene cloning and expression technologies*, Westborough, M. A., EE. UU., Eaton Publishing, págs. 391-411; Lin y col. (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 89(2): 148-56; Wang y col. (2001) *Science* 292(5516): 498-500; Wang y col. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(1): 56-61; Chin y col. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124(31): 9026-7; Farrell y col. (2005) *Nat. Methods* 2(5): 377-84. Liu y col. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125(7): 1702-3.

RESUMEN DE LA INVENCION

45

[0006] Se proporcionan procedimientos para una síntesis acelular de proteínas de gran rendimiento con extractos de células bacterianas a partir de un molde polinucleotídico, en que la proteína sintetizada se modifica para comprender uno o más aminoácidos no naturales incorporados en sitios específicos. El extracto de células bacterianas se deriva de una cepa bacteriana en la que *ompT* está mutado. La proteína se sintetiza en una mezcla de reacción acelular que comprende al menos un ARNt ortogonal aminoacilado con un aminoácido no natural, en que el ARNt ortogonal se aparea con un codón que normalmente no se asocia con ningún aminoácido, por ejemplo, un codón de parada; un codón de cuatro pb, etc. La mezcla de reacción comprende también una ARNt-sintetasa capaz de aminoacilar el ARNt ortogonal con un aminoácido no natural. Normalmente, la ARNt-sintetasa, que puede ser degradada por proteasas presentes en los extractos de células bacterianas, se sintetiza exógenamente y se añade a la mezcla de reacción antes de la iniciación de la síntesis del polipéptido. El ARNt ortogonal puede sintetizarse en las células bacterianas de las que se obtiene el extracto celular, puede sintetizarse nuevamente durante la reacción de síntesis del polipéptido o puede añadirse exógenamente a la mezcla de reacción.

[0007] Los procedimientos de la invención proporcionan grandes rendimientos de proteína modificada activa.

Las proteínas producidas de esta manera, incluidas proteínas que contienen puentes disulfuro, proteínas secretadas, proteínas unidas a membranas, proteínas multiméricas, etc., son biológicamente activas. En algunas realizaciones, la síntesis se lleva a cabo como una reacción acoplada de transcripción y traducción.

- 5 **[0008]** En una realización, las condiciones de la reacción de síntesis proporcionan la activación *in vitro* de la fosforilación oxidativa. La activación de la fosforilación oxidativa puede ponerse de manifiesto por la sensibilidad de la síntesis a inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Tales reacciones no contienen sustancialmente polietilenglicol.
- 10 **[0009]** El sistema de síntesis acelular de proteínas proporciona una plataforma flexible para la expresión de proteínas que contienen aminoácidos no naturales. En diversas realizaciones, el sistema se modifica para conseguir un resultado específico. El número y la naturaleza de los aminoácidos no naturales varía de acuerdo con la modificación deseada. Se usan diversas fuentes para el ARNt ortogonal y la ARNt-sintetasa, incluidas especies bacterianas, de arqueobacterias o de mamíferos.
- 15 **[0010]** A la mezcla de reacción se le añaden opcionalmente componentes que afectan la inserción de los aminoácidos no naturales y a la inserción o el plegamiento de las proteínas. Tales componentes incluyen concentraciones elevadas de factores de traducción para minimizar el efecto de los factores de liberación 1 y 2 y para optimizar aún más las concentraciones de los componentes ortogonales. También pueden añadirse
- 20 chaperonas de proteínas (sistema Dsb de oxidorreductasas e isomerasas, GroES, GroEL, DNAJ, DNAK, Skp, etc.) de manera exógena a la mezcla de reacción o estas pueden expresarse en exceso en las células fuente usadas para preparar el extracto celular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 **[0011]** Figura 1. Análisis mediante autorradiografía de la incorporación de *o*-metiltirosina (OMe-Tyr) en mGM-CSF mediante la estrategia I de incorporación de aminoácidos no naturales. Las cantidades de ARNt ortogonal (*o*-) purificado de *Methanococcus jannaschii* y de *o*-metiltirosina-sintetasa añadidas en las reacciones acelulares PANOx-SP se variaron. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% y se compararon
- 30 con el estándar de peso molecular Mark 12. La banda 1 consta de productos proteínicos diméricos, la banda 2 corresponde a productos proteínicos de longitud completa que incorporan *o*-metiltirosina y la banda 3 es un producto proteínico truncado (truncado en el resto 75). El carril 2 muestra un estándar de mGM-CSF purificada con todos los aminoácidos naturales.
- 35 **[0012]** Figura 2. Rendimientos de la síntesis acelular de proteínas para la incorporación de *o*-metiltirosina en cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) mediante distintas estrategias de desarrollo del procedimiento. Las concentraciones de CAT activa se determinaron por medio de un ensayo de actividad a base de colorimetría [26] y se confirmaron por recuento de centelleo después de la incorporación de L-[U-¹⁴C]-leucina. El análisis mediante autorradiografía se llevó a cabo con un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% en el tampón MES. Estos datos son la media
- 40 de n = 6 experimentos.
- [0013]** Figura 3. Análisis mediante autorradiografía de CAT con *p*-azidofenilalanina (los resultados con *o*-metiltirosina y *p*-acetilfenilalanina fueron similares). Los autorradiogramas se revelaron a partir de geles de Bis-Tris NuPAGE al 10%, cuya electroforesis se llevó a cabo en el tampón MES. (A) Producción de proteína modificada
- 45 después de una reacción acelular de 5 h a 30°C tras la transcripción controlada del ARNt en el extracto celular (ejemplo derivado de la cepa celular KC6) y con la adición de cantidades crecientes de la sintetasa ortogonal. (B, C) Autorradiografía de la evolución temporal y rendimientos de CAT activa durante la síntesis acelular de proteínas en el sistema PANOx-SP-AAAnn. Se usaron aproximadamente 167 µg/ml de *p*-azidofenilalanina-sintetasa ortogonal en la reacción acelular de 22 h realizada a 30°C.
- 50 **[0014]** Figura 4. Análisis mediante autorradiografía de la acumulación de la sintetasa ortogonal después de su expresión en una reacción de síntesis acelular de proteínas. El autorradiograma se reveló a partir de un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10%, sometido a electroforesis en el tampón MES. La *p*-azidofenilalanina-ARNt-sintetasa sufre una intensa degradación por proteasas en el extracto de células KC6. La sintetasa no se degrada cuando se usan las
- 55 cepas celulares mutantes ARG1, ARG2 o MCJ29 para producir los extractos celulares (se proporciona un solo ejemplo, ya que todos los resultados fueron similares). Cuando se incorpora la delección o mutación de *ompT* en las cepas celulares KC6 o KGK10, la sintetasa producida nuevamente es estable.
- [0015]** Figura 5. Los rendimientos de cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) activa a partir de reacciones que

emplean estrategias de reacción I a IIIc muestran las notables mejoras proporcionadas por esta invención. Las fases de desarrollo I y II implican la incorporación del ARNt y la sintetasa purificados en cantidades fisiológicas (los rendimientos son similares a los descritos en el ejemplo 1). La estrategia de desarrollo IIIa implica la expresión de la sintetasa ortogonal y el ARNt *in vivo* (extracto de células KC6). La estrategia de desarrollo IIIb implica la transcripción del ARNt *in vivo* y la adición de menos de 167 µg/ml de la sintetasa ortogonal purificada y activa. La estrategia de desarrollo IIIc resulta de mejoras en las relaciones entre los componentes del sistema PANOx-SP-AAAnn, el entorno de la reacción y el protocolo de preparación del extracto y la expresión del ARNt. El análisis de los productos proteínicos por medio de autorradiografía muestra que la mayor parte del producto de la reacción acelular es una proteína de longitud completa que contiene un aminoácido no natural. Estos resultados se reprodujeron en más de n = 6 experimentos.

[0016] Figura 6. Producción de proteína modificada de proteínas que contienen puentes disulfuro. Los aminoácidos no naturales *p*-azidofenilalanina y *p*-acetilfenilalanina se incorporaron satisfactoriamente en hGM-CSF y mGM-CSF (solo se muestran los rendimientos acelulares para *p*-azidofenilalanina). El autorradiograma para la incorporación de los dos, *p*-azidofenilalanina y *p*-acetilfenilalanina, confirma que el nuevo sistema acelular PANOx-SP-AAAnn sintetiza un producto modificado de longitud completa. La cepa celular KC6 que contiene el plásmido pK7tRNA_{mj} se usó para preparar el extracto celular. Para cada aminoácido no natural y proteína se llevaron a cabo tres reacciones acelulares independientes a 30°C durante 6 h.

[0017] Figura 7. Resultados de los ensayos de bioactividad para hGM-CSF y mGM-CSF para los productos proteínicos modificados descritos en la figura 6. Prácticamente todo el producto de longitud completa (fracción soluble) producido está plegado correctamente y muestra bioactividad cuando se analiza en el ensayo basado en la proliferación celular. Las muestras se analizaron por triplicado (n = 3).

[0018] Figura 8. Análisis mediante autorradiograma de la producción acelular de la proteína de membrana TetA de longitud completa con un AAnn (*p*-azidofenilalanina) incorporado en los restos 34 ó 182. También se muestra la distribución de los productos proteínicos de TetA separados por un ensayo de flotación en gradiente de sacarosa. La proteína TetA sintetizada se identificó por su radiactividad después de la incorporación de ¹⁴C-leucina. La TetA asociada a vesículas flota hasta la fracción 2, mientras la TetA agregada permanece en el fondo del gradiente, en las fracciones 5-7. El sistema acelular de glutamato y fosfato se usó para sintetizar estas proteínas de membrana, lo que asegura una ruta de fosforilación oxidativa activa.

[0019] Figura 9. Análisis mediante autorradiografía de la digestión con proteasa K de la TetA modificada con *p*-azidofenilalanina en los restos 34 y 182. Para este experimento se usó un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% en el tampón MES. La sustitución "interna" con un aminoácido no natural se encuentra en el lado periplásmico de la membrana (dentro de la vesícula) y la inserción "externa" de un aminoácido no natural corresponde al lado citoplásmico de la membrana (fuera de la vesícula).

[0020] Figura 10. Rendimiento de la síntesis acelular de proteínas con el vector de expresión pET24a_MS2cp_T15STOP (reacciones de 30 µl, n = 2).

[0021] Figura 11. Perfil de sedimentación por velocidad en un gradiente de densidad de sacarosa del 10% al 40% (con etapas de 2,5%) de muestras de la cápsida de MS2 sintetizadas con aminoácidos naturales (+ control) y con supresión del codón de parada por *p*-azidofenilalanina en la posición 15 (AA no natural). La localización de la proteína de la cubierta de MS2 radiomarcada se determina por recuento de centelleo de la ¹⁴C-leucina incorporada.

[0022] Figura 12. Gel de SDS-PAGE (gel de Bis-Tris al 10% con MES como tampón de electroforesis, Invitrogen; condiciones de electroforesis, 60 min a 60 mA; tinción con SimplySafe, Invitrogen) de las fracciones 12 a 15 de la muestra con aminoácidos no naturales separada por gradiente de densidad de sacarosa mostrada en la figura 11 y de las fracciones 11 a 15 de la muestra + control (20 µl de la fracción; 7,25 µl de tampón de muestras de LDS para NuPAGE, Invitrogen; DTT 0,625 mM, Invitrogen). El peso molecular del monómero de la proteína de la cubierta de MS2 es 13,7 kDa.

[0023] Figura 13. Autorradiograma del gel mostrado en la figura 12.

[0024] Figuras 14A-D. Análisis de espectroscopía de masas del fragmento de quimotripsina relevante de la proteína de la cubierta de MS2 aislada de partículas VLP sintetizadas con *p*-azidofenilalanina o con tirosina en la posición 15. Los productos de control y con *p*-azidofenilalanina se aislaron primeramente y después se digirieron con quimotripsina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

[0025] En los procedimientos de la invención se sintetiza una proteína diana en una mezcla de reacción
 5 acelular que comprende al menos un ARNt ortogonal aminoacilado con un aminoácido no natural, en que el ARNt
 ortogonal se aparea con un codón sin sentido que normalmente no se asocia con ningún aminoácido, por ejemplo,
 un codón de parada; un codón de cuatro pb, etc. En los procedimientos se incluyen reacciones acopladas de
 transcripción y traducción. La invención usa la supresión de codones sin sentido durante la síntesis acelular de
 proteínas para producir grandes rendimientos de polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales. Los
 10 polipéptidos de interés incluyen, sin limitación, proteínas que contienen puentes disulfuro, cualquier combinación
 heterogénea u homogénea de proteínas, incluidas proteínas de fusión, proteínas de cubiertas víricas y/o proteínas
 secretadas originalmente a través o dentro de una membrana celular. Los aminoácidos no naturales son cualquier
 análogo de aminoácidos o entidad similar que no se encuentra normalmente en la naturaleza, incluidas, pero sin
 limitarse a aquellas moléculas que pueden usarse para la modificación postraduccional dirigida. La mezcla de
 15 reacción comprende extractos celulares que opcionalmente son extractos celulares con aminoácidos estabilizados,
 reductasas minimizadas y/o proteasas mutadas.

[0026] Sorprendentemente, se ha encontrado que, aunque las células bacterianas a partir de las cuales se
 prepara un extracto para la síntesis acelular pueden sintetizar ARNt ortogonal con fiabilidad, la ARNt-sintetasa
 20 ortogonal puede degradarse en los extractos de células bacterianas. Al menos un factor en esta degradación es la
 presencia de la proteasa OmpT en la célula bacteriana. Normalmente, esta proteasa no entra en contacto con
 polipéptidos en el citoplasma de la célula y, por lo tanto, no afecta adversamente a los componentes ortogonales
 durante la síntesis de polipéptidos con aminoácidos no naturales en células intactas. En los procedimientos de la
 invención, la ARNt-sintetasa se sintetiza exógenamente y se añade a la mezcla de reacción acelular. La mezcla de
 25 reacción se prepara a partir de células bacterianas en las que *ompT* ha sido inactivado o es naturalmente inactivo.

[0027] Los procedimientos de la invención proporcionan elevados rendimientos de proteína modificada activa,
 que pueden ser mayores que el rendimiento que puede alcanzarse con sistemas de expresión *in vivo*. En una
 realización de la invención, el rendimiento de proteína modificada activa es de al menos aproximadamente 50 µg/ml
 30 de mezcla de reacción, al menos aproximadamente 100 µg/ml de mezcla de reacción, al menos aproximadamente
 250 µl/ml de mezcla de reacción o más. Una porción sustancial del polipéptido diana así producido contiene el
 aminoácido no natural deseado, normalmente al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el
 75%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 99% o
 superior.
 35

[0028] Una proteína modificada, o proteína diana, según se usa en este documento, comprende al menos un
 aminoácido no natural e un sitio predeterminado y puede comprender o contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más
 aminoácidos no naturales. Si están presentes en dos o más sitios en el polipéptido, los aminoácidos no naturales
 pueden ser iguales o diferentes. Cuando los aminoácidos no naturales son diferentes, habrá presentes un ARNt
 40 ortogonal y una ARNt-sintetasa correspondiente para cada aminoácido no natural. Los aminoácidos no naturales
 incluyen, sin limitación, *p*-acetilfenilalanina, *p*-etilfenilalanina, *p*-propargiloxifenilalanina y *p*-azidofenilalanina.

[0029] Los procedimientos de la presente invención proporcionan proteínas con aminoácidos no naturales que
 tienen una actividad biológica comparable a la de la proteína nativa. Es posible determinar la actividad específica de
 45 una proteína en una composición mediante la determinación del nivel de actividad en un ensayo funcional, la
 cuantificación de la cantidad de proteína presente en un ensayo no funcional, por ejemplo, inmunotinción, ELISA,
 cuantificación en un gel teñido con azul de Coomassie o con plata, etc., y mediante la determinación de la relación
 entre la proteína biológicamente activa y la proteína total. Generalmente, la actividad específica así definida será al
 menos de aproximadamente el 5% de la de la proteína nativa, normalmente de al menos el 10% de la de la proteína
 50 nativa y puede ser de aproximadamente el 25%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 90% o superior.

[0030] Los procedimientos de la invención proporcionan grandes rendimientos de proteínas de cubiertas
 víricas autoensamblables. Una porción sustancial de la proteína puede ensamblarse en partículas pseudovíricas
 (VLP) estables, normalmente al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos
 55 aproximadamente el 75% o más, en que una VLP estable mantiene una estructura de la cápsida que comprende al
 menos aproximadamente 60 cadenas polipeptídicas en condiciones fisiológicas durante periodos de tiempo
 prolongados, por ejemplo, durante al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente una semana,
 al menos aproximadamente un mes o más. Una vez ensamblada la VLP puede tener una estabilidad equiparable a
 la de la partícula vírica nativa, por ejemplo, al ser expuesta a cambios de pH, calor, congelación, cambios iónicos,

etc.

[0031] Los polipéptidos sintetizados por los procedimientos de la invención proporcionan los beneficios de ser capaces de unir cualquier ligando (contenga o no puentes disulfuro) al polipéptido a través del enlace covalente de aminoácidos no naturales con otros aminoácidos no naturales. Es posible usar enlazantes para enlazar dos aminoácidos no naturales similares o únicos, por ejemplo, entre dos cadenas polipeptídicas. Pueden llevarse a cabo modificaciones postraduccionales específicas en sitios únicos o múltiples con el uso de ligandos similares o diferentes por medio de, pero sin limitarse a reacciones suaves de cicloadición [3+2] o la reactividad específica del ligando con un "mango cetónico" único. Alternativamente, un grupo azido puede enlazarse a un alquino, en que uno de estos está incorporado en la superficie del polipéptido y el otro es parte de un enlazante o un ligando.

DEFINICIONES

[0032] Ha de entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos concretos descritos, ya que estos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en este documento tiene solamente la finalidad de describir realizaciones concretas y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que quedará solo limitado por las reivindicaciones adjuntas.

[0033] Según se usa en este documento, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el cultivo" incluye la referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

[0034] Los términos "*proteína deseada*" o "*proteína seleccionada*" se usan de manera intercambiable y generalmente se refieren a cualquier péptido o proteína con más de aproximadamente cinco aminoácidos que comprende al menos un aminoácido no natural, en que dicho aminoácido no natural está codificado en un sitio específico en un polinucleótido codificante de la proteína. Los polipéptidos pueden ser homólogos, o pueden ser exógenos, lo que quiere decir que son heterólogos, es decir, extraños a la bacteria de la que deriva el extracto bacteriano acelular, como una proteína humana, una proteína vírica, una proteína de levadura, etc., producidas en el extracto bacteriano acelular.

[0035] Algunos ejemplos de polipéptidos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a moléculas como renina; hormonas de crecimiento, incluida la hormona del crecimiento humana; la hormona del crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona del crecimiento; la hormona paratiróidea; la hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α 1-antitripsina; la cadena A de la insulina; insulina; proinsulina; la hormona estimulante del folículo; calcitonina; la hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular y el factor de von Willebrand; factores anticoagulantes como la proteína C; el factor natriurético auricular; el tensorio pulmonar; un activador del plasminógeno como la urocinasa de orina humana o el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; el factor de crecimiento hematopoyético; los factores de necrosis tumoral α y β ; encefalina; RANTES y otras quimiocinas; la proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1 α); una seroalbúmina como la seroalbúmina humana; la sustancia inhibidora mulleriana; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; prorrelaxina; el péptido asociado con la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana como la β -lactamasa; ADNasa; inhibina; activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso como NGF- β ; el factor de crecimiento plaquetario (PDGF); un factor de crecimiento de fibroblastos como α FGF y β FGF; el factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF) como TGF- α y TGF- β , incluidos TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; los factores de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide; proteínas CD como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón como los interferones α , β y γ ; factores de estimulación de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-18; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas superficiales de membrana; el factor acelerador de la descomposición; antígenos víricos como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte, receptores de retorno; adresasinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente.

[0036] Las proteínas de cubiertas víricas de interés incluyen cualquiera de los tipos víricos conocidos, por ejemplo, virus de ADN bicatenario, como el virus de la viruela; el virus de la vacuna; los virus del herpes, incluido el virus de la varicela-zóster; VHS1, VHS2, VHSK, CMV, VEB; los adenovirus; el virus de la hepatitis B; SV40; los fagos T-pares, como el fago T4, el fago T2; el fago λ ; etc. Los virus de ADN monocatenario incluyen ϕ X174; el virus adenoasociado, etc. Los virus de ARN de cadena negativa incluyen el virus del sarampión; el virus de las paperas, el virus sincitial respiratorio (VSR); los virus paragripales (VPI); el metaneumovirus; el virus de la rabia; el virus Ébola; el virus de la gripe; etc. Los virus de ARN de cadena positiva incluyen los poliovirus; los rinovirus, los coronavirus; el virus de la rubéola; el virus de la fiebre amarilla; el virus del Nilo occidental; el virus de la fiebre del dengue; los virus de la encefalitis equina; los virus de la hepatitis A y la hepatitis C; el virus del mosaico del tabaco (VMT); etc. Los virus de ARN bicatenarios incluyen los reovirus; etc. Los retrovirus incluyen el virus del sarcoma de Rous; lentivirus como VIH-1 y VIH-2; etc.

[0037] Los bacteriófagos tienen interés, por ejemplo, el bacteriófago MS2. La familia *Myoviridae* (fagos con colas contráctiles) incluye virus similares a μ ; virus similares a P1, por ejemplo, P1; ϕ W39, etc.; virus similares a P2; virus similares a SPO-1; virus similares a T4; etc. La familia *Podoviridae* (fagos con colas cortas) incluye virus similares a N4; virus similares a P22, por ejemplo P22; virus similares a ϕ 29, por ejemplo, ϕ 29; virus similares a T7, por ejemplo, T3, T7; W31; etc. La familia *Siphoviridae* (fagos con colas largas no contráctiles) incluyen virus similares a c2; virus similares a L5; virus similares a λ , por ejemplo, el fago λ , HK022, HK97, etc.; virus similares a N15; virus similares a ϕ C31; virus similares a ψ M1; virus similares a T1, por ejemplo, el fago T1, etc. La familia *Microviridae* (fagos isométricos de ADN monocatenario) incluye microvirus de clamidia; microvirus, por ejemplo, el fago α 3, el fago WA13, etc.; el fago G4; el fago ϕ X174 y colifagos relacionados. Muchos fagos adicionales conocidos por los expertos en la técnica siguen sin clasificar. La secuencia de numerosas proteínas de cubierta está disponible públicamente.

[0038] *Aminoácidos no naturales.* Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales que pueden usarse en los procedimientos de la invención incluyen: un análogo no natural del aminoácido tirosina; un análogo no natural del aminoácido glutamina; un análogo no natural del aminoácido fenilalanina; un análogo no natural del aminoácido serina; un análogo no natural del aminoácido treonina; un aminoácido sustituido con un grupo alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidracina, hidrazida, hidroxilo, alqueniilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fósforo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o amino o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un entrecruzador fotoactivable; un aminoácido marcado con espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un nuevo grupo funcional; un aminoácido que interacciona de manera covalente o no covalente con otra molécula; un aminoácido que se une a un metal; un aminoácido que contiene un metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoenjaulado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o un análogo de biotina; un aminoácido glucosilado o un aminoácido modificado con un carbohidrato; un aminoácido que contiene un grupo ceto; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado; un aminoácido que puede escindirse químicamente o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral extendida; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con un azúcar, por ejemplo una serina o similar sustituida con un azúcar; un aminoácido que contiene un azúcar enlazado a un carbono; un aminoácido con actividad redox; un ácido que contiene un grupo α -hidroxi; un aminoácido que contiene un aminotioácido; un aminoácido α,α -disustituido; un β -aminoácido; un aminoácido cíclico distinto de prolina, etc.

[0039] Los aminoácidos no naturales de interés incluyen, sin limitación, aminoácidos que proporcionan un grupo reactante para reacciones de química clic (véase Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless, Angewandte Chemie, edición internacional, volumen 40, 2001, pág. 2004). Por ejemplo, son de interés los aminoácidos *p*-acetil-L-fenilalanina y *p*-azido-L-fenilalanina.

[0040] *Componentes ortogonales.* Según se usa en este documento, los componentes ortogonales incluyen un ARNt aminoacilado con un aminoácido no natural, en que el ARNt ortogonal se aparea con un codón que normalmente no se asocia con ningún aminoácido, por ejemplo, un codón de parada; un codón de cuatro pb, etc. La mezcla de reacción puede comprender además una ARNt-sintetasa capaz de aminoacilar (con un aminoácido no natural) el ARNt ortogonal correspondiente. Tales componentes son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en la patente de los EE. UU. n° 7.045.337, c oncedida el 16 de mayo de 2006. El ARNt ortogonal reconoce un codón selector, el cual puede ser un codón sin sentido, como los codones de parada, por ejemplo ámbar, ocre y ópalo; codones de cuatro o más bases; codones derivados de pares de bases naturales o no naturales y similares. El bucle anticodón del ARNt ortogonal reconoce el codón selector en el ARNm e incorpora el aminoácido no natural

en este sitio en el polipéptido.

[0041] Preferentemente, la ARNt-sintetasa ortogonal se sintetiza de manera exógena, se purifica y se añade a la mezcla de reacción de la invención, normalmente en una cantidad definida o de al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 20 µg/ml, al menos aproximadamente 30 µg/ml y de no más de aproximadamente 200 µg/ml. La proteína puede sintetizarse en células bacterianas o eucariotas y purificarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad, PAGE, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase inversa y similares, según se conocen en la técnica.

10 **[0042]** El ARNt ortogonal puede sintetizarse en las células a partir de las cuales se obtiene el extracto para la síntesis acelular; puede sintetizarse de manera exógena, purificarse y añadirse a la mezcla de reacción o puede sintetizarse nuevamente, en los casos en que la reacción de síntesis acelular permite reacciones de transcripción y traducción. Cuando el ARNt ortogonal se sintetiza en las células a partir de las cuales se obtiene el extracto para la síntesis acelular, la expresión puede controlarse a través de la selección apropiada de promotores, medio y
15 similares.

[0043] La síntesis *in vitro*, según se usa en este documento, se refiere a la síntesis acelular de polipéptidos 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
20 síntesis de la macromolécula, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc. y aquellos cofactores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores transcripcionales, etc. Tales sistemas de reacción sintéticos son bien conocidos en la técnica y han sido descritos en la bibliografía. La reacción de síntesis acelular puede llevarse a cabo de manera discontinua, como un flujo continuo o un flujo semicontinuo, según se conoce en la técnica.

25 **[0044]** En algunas realizaciones de la invención, la síntesis acelular se lleva a cabo en una reacción en la que la fosforilación oxidativa está activada, por ejemplo, el sistema CYTOMIM™. La activación de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa se manifiesta por un aumento de la síntesis de polipéptidos en presencia de O₂. En las reacciones en las que la fosforilación oxidativa está activada, la síntesis general de polipéptidos en presencia de O₂
30 se reduce al menos aproximadamente el 40% en presencia de un inhibidor específico de la cadena de transporte de electrones, como HQNO, o en ausencia de O₂. La química de la reacción puede ser según se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/016778.

[0045] El entorno para síntesis CYTOMIM™ utiliza extractos celulares derivados de células bacterianas
35 cultivadas en un medio que contiene glucosa y fosfato, en que la glucosa está presente inicialmente en una concentración de al menos aproximadamente el 0,25% (peso/volumen), más normalmente de al menos aproximadamente el 1%; y normalmente de no más de aproximadamente el 4%, más normalmente de no más de aproximadamente el 2%. Un ejemplo de tales medios es el medio 2YTPG, sin embargo, el experto en la técnica apreciará que numerosos medios de cultivo pueden adaptarse para esta finalidad, ya que hay numerosos medios
40 publicados adecuados para el cultivo de bacterias como *E. coli*, con el uso de fuentes de nutrientes tanto definidas como indefinidas (véase Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. para ejemplos de medios que contienen glucosa). Alternativamente, el cultivo puede llevarse a cabo mediante un protocolo en el que la glucosa se suministra de manera continua según se requiera para mantener una elevada tasa de crecimiento en un medio de
45 cultivo definido o complejo.

[0046] La mezcla de reacción puede complementarse con la inclusión de vesículas, por ejemplo, una disolución de vesículas de membrana interna. Cuando se suministran, estas vesículas pueden comprender desde
50 aproximadamente 0 hasta aproximadamente 0,5 volúmenes, normalmente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,4 volúmenes.

[0047] En algunas realizaciones puede haber PEG presente en cantidades solo mínimas, por ejemplo, de menos del 0,1%, y que pueden ser menores del 0,01%. Las reacciones que sustancialmente no contienen PEG contienen concentraciones de PEG suficientemente bajas para que, por ejemplo, la fosforilación oxidativa no quede
55 inhibida por PEG. Las moléculas espermidina y putrescina pueden usarse en lugar de PEG. La espermina o espermidina está presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM, normalmente de al menos aproximadamente 1 mM, preferentemente de aproximadamente 1,5 mM y de no más de aproximadamente 2,5 mM. La putrescina está presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM, preferentemente de al menos aproximadamente 1 mM, preferentemente de aproximadamente 1,5 mM y de no más de aproximadamente

2,5 mM. La espermidina y/o la putrescina pueden estar presentes en el extracto celular inicial o puede añadirse separadamente.

[0048] La concentración de magnesio en la mezcla de reacción afecta a la síntesis general. Con frecuencia hay magnesio presente en los extractos celulares, que pueden ajustarse después con magnesio adicional para optimizar la concentración. Las fuentes de sales de magnesio útiles en tales procedimientos son conocidas en la técnica. En una realización de la invención, la fuente de magnesio es glutamato de magnesio. Una concentración de magnesio preferida es de al menos aproximadamente 5 mM, normalmente de al menos aproximadamente 10 mM y preferentemente de al menos aproximadamente 12 mM; y una concentración de no más de aproximadamente 25 mM, normalmente de no más de aproximadamente 20 mM. Otros cambios que pueden mejorar la síntesis o reducir los costes incluyen la omisión del tampón HEPES y de fosfoenolpiruvato en la mezcla de reacción.

[0049] El sistema puede operarse en condiciones aerobias y anaerobias. Puede suministrarse oxígeno, especialmente para reacciones de más de 15 μ l, con el fin de aumentar los rendimientos de síntesis. El espacio de cabeza de la cámara de reacción puede rellenarse con oxígeno; el oxígeno puede infundirse en la mezcla de reacción, etc. El oxígeno puede suministrarse de manera continua o el espacio de cabeza de la cámara de reacción puede rellenarse durante el transcurso de la expresión de la proteína para tiempos de reacción mayores. También pueden suministrarse otros aceptores de electrones como nitrato, sulfato o fumarato, en combinación con la preparación de los extractos celulares, de modo que las enzimas requeridas sean activas en el extracto celular.

[0050] No es necesario añadir cofactores exógenos para la activación de la fosforilación oxidativa. Para aumentar los rendimientos de la síntesis de proteínas pueden usarse compuestos como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), NAD^+ o acetilcoenzima A, pero no se requieren. La adición de ácido oxálico, un inhibidor metabólico de la fosfoenolpiruvato-sintetasa (Pps) puede ser beneficiosa para aumentar los rendimientos de proteína, pero no es necesaria.

[0051] El molde para la síntesis acelular de proteínas puede ser ARNm o ADN, preferentemente un sistema combinado que genere continuamente ARNm a partir de un molde de ADN con un promotor reconocible. Se usa una ARN-polimerasa endógena o se añade directamente a la mezcla de reacción una ARN-polimerasa fágica exógena, típicamente de T7 o SP6. Alternativamente, el ARNm puede amplificarse continuamente mediante la inserción del mensaje en un molde para la replicasa del fago Q β , una ARN-polimerasa dependiente de ARN. Generalmente, el ARNm purificado se estabiliza por modificación química antes de añadirlo a la mezcla de reacción. Las nucleasas de los extractos pueden eliminarse para contribuir a estabilizar los niveles de ARNm. El molde puede codificar cualquier gen concreto de interés.

[0052] También pueden añadirse otras sales, especialmente aquellas de importancia biológica, como las de manganeso. Generalmente hay potasio presente en una concentración de al menos aproximadamente 50 mM y de no más de aproximadamente 250 mM. También puede haber amonio presente, normalmente en una concentración de no más de 200 mM, más normalmente en una concentración de no más de aproximadamente 100 mM. Normalmente, la reacción se mantiene en el intervalo de pH de aproximadamente 5-10 y a una temperatura de aproximadamente 20°-50°C, más normalmente en el intervalo de pH de aproximadamente 6-9 y a una temperatura de aproximadamente 25°-40°C. Estos intervalos pueden extenderse para condiciones específicas de interés.

[0053] A la mezcla de reacción pueden añadirse inhibidores metabólicos de una actividad enzimática no deseada. Alternativamente, los enzimas o factores responsables de una actividad no deseada pueden eliminarse directamente del extracto o el gen que codifica la enzima no deseada puede inactivarse o delecionarse del cromosoma.

[0054] *Extractos biológicos.* Para los fines de esta invención, los extractos biológicos son cualquier preparación que comprende los componentes requeridos para la maquinaria de síntesis de proteínas, normalmente un extracto de células bacterianas, en que dichos componentes son capaces de expresar un ácido nucleico que codifica una proteína deseada. Por lo tanto, un extracto bacteriano comprende componentes que son capaces de traducir un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica una proteína deseada y opcionalmente comprende componentes que son capaces de transcribir el ADN que codifica una proteína deseada. Tales componentes incluyen, por ejemplo, ARN-polimerasa dirigida por ADN (ARN polimerasa), cualquier activador de la transcripción requerido para la iniciación de la transcripción del ADN que codifica la proteína deseada, ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt), aminoacil-ARNt-sintetasas, ribosomas de 70S, N^{10} -formiltetrahidrofolato, formilmetionina-ARNt^{Met}-sintetasa, peptidil-transferasa, factores de iniciación como IF-1, IF-2 e IF-3, factores de elongación como EF-Tu, EF-Ts y EF-G, factores de liberación como RF-1, RF-2 y RF-3 y similares.

- [0055]** En la invención, la mezcla de reacción comprende un extracto de células bacterianas derivado de una cepa bacteriana en la que *ompT* está mutado. En una realización preferida de la invención, la mezcla de reacción comprende extractos de células bacterianas, por ejemplo, extractos S30 de *E. coli*, según se conocen en la técnica.
- 5 En algunas realizaciones, la cepa bacteriana está modificada de modo que expresa endógenamente un ARNt ortogonal. Por razones de conveniencia, el organismo usado como fuente de los extractos puede denominarse organismo fuente. Los procedimientos para producir extractos activos son conocidos en la técnica, por ejemplo pueden encontrarse en Pratt (1984), Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems, págs. 179-209, en Hames, B. D. y Higgins, S. J. (ed.), Transcription and Translation: A Practical Approach, IRL Press, Nueva York. Kudlicki y col. (1992) Anal. Biochem. 206(2): 389-93 modifican el extracto acelular S30 de *E. coli* mediante la recogida de la fracción ribosómica de S30 por ultracentrifugación. Zawada y Swartz (2006) Biotechnol. Bioeng. 94(4): 618-24 y Liu y col. (2005) Biotechnol. Progr. 21: 460 exponen un procedimiento modificado para la preparación del extracto.
- 10
- 15 **[0056]** La cepa bacteriana a partir de la cual se deriva el extracto puede modificarse adicionalmente para los fines de la invención. En una realización, el extracto se deriva de una cepa de *E. coli* deficiente en una o más proteínas, por ejemplo, las cepas KC6 (A19 Δ tonA Δ tnaA Δ speA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB Δ gshA met⁺), KGK10 (A19 Δ speA Δ tnaA Δ tonA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB Δ gshA Δ gor met⁺, que puede incluir TrxB-HA), ARG1 (A19 Δ tonA Δ tnaA Δ speA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB Δ gshA met⁺ OmpTD83A), ARG2 (A19 Δ speA Δ tnaA Δ tonA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB Δ gshA Δ gor met⁺ OmpTD83A, que puede incluir TrxB-HA), MCJ29 (A19 Δ speA Δ tnaA Δ ompT- Δ ptrC Δ degP Δ tonA Δ endA met⁺) y similares.
- 20
- [0057]** *Plegamiento*, según se usa en este documento, se refiere al proceso de formación de la estructura tridimensional de los polipéptidos y proteínas, en que interacciones entre restos aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Las interacciones no covalentes son importantes para determinar la estructura y el efecto de los contactos de membranas con la proteína puede ser importante para una estructura correcta. Para las proteínas y polipéptidos de origen natural o derivados o variantes de los mismos, el resultado de un plegamiento correcto es típicamente el ordenamiento que resulta en una actividad biológica óptima y puede monitorizarse convenientemente mediante ensayos de actividad, por ejemplo, unión de ligandos, actividad enzimática, etc.
- 25
- 30 **[0058]** En algunos casos, por ejemplo, cuando el producto deseado es de origen sintético, los ensayos basados en la actividad biológica pueden tener menor significado. El plegamiento correcto de tales moléculas puede determinarse sobre la base de propiedades físicas, consideraciones energéticas, estudios de modelado y similares.
- 35 **[0059]** La síntesis de proteínas asociadas a membranas puede venir seguida del aislamiento directo de las formas activas asociadas a las membranas, es decir, en ausencia de replegamiento o de la introducción postraducciona de membranas. El procedimiento de separación puede utilizar condiciones que mantengan la integridad de las membranas, según se conocen en la técnica, o puede usar cualquiera de los varios detergentes con actividad sobre membranas usados para aislar proteínas de membrana, según se practica normalmente en la técnica.
- 40
- [0060]** Los procedimientos de separación de interés incluyen la cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad hace uso de los sitios de unión de gran especificidad que se encuentran normalmente presentes en macromoléculas biológicas para separar las moléculas en función de su capacidad para unirse a un ligando concreto. El ligando se une a un medio de soporte poroso insoluble por medio de enlaces covalentes, de modo que dicho ligando se presenta abiertamente a la muestra de proteína, con lo que se usa la unión bioespecífica natural de una especie molecular para separar y purificar una segunda especie a partir de una mezcla. En la cromatografía de afinidad se usan normalmente anticuerpos. Preferentemente, como soporte para la cromatografía de afinidad se usa una microesfera o matriz. Tales soportes son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente e incluyen soportes activados que pueden acoplarse a las moléculas enlazantes. Por ejemplo, los soportes Affi-Gel, a base de agarosa o poliacrilamida, son geles de baja presión adecuados para la mayoría de las purificaciones a escala de laboratorio con una bomba peristáltica o elución por flujo de gravedad. Los soportes Affi-Prep, a base de un polímero macroporoso estable a la presión, son adecuados para aplicaciones preparativas y de escala industrial.
- 50
- 55 **[0061]** Las proteínas también pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico y/o concentrarse, filtrarse, dializarse, etc., mediante los procedimientos conocidos en la técnica.

PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS

[0062] Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala o pueden combinarse para llevar a cabo una pluralidad de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas usarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos y el producto final puede aislarse como parte del proceso. También tienen interés los sistemas discontinuos, en los que pueden introducirse reactivos adicionales para prolongar el periodo de tiempo de la síntesis activa. Un reactor puede operarse en cualquier modo, por ejemplo discontinuo, discontinuo extendido, semidiscontinuo, semicontinuo, discontinuo con alimentación y continuo, que se seleccionará de acuerdo con el fin de la aplicación.

[0063] Las estrategias de síntesis, en las que se introduce al menos un aminoácido no natural en la cadena polipeptídica durante la elongación incluyen, pero no se limitan a: (I) la adición de la sintetasa ortogonal purificada exógenamente, el aminoácido no natural y el ARNt ortogonal a la reacción acelular, (II) la adición de la sintetasa ortogonal purificada exógenamente y el aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero con el ARNt ortogonal transcrito durante la reacción acelular, (III) la adición de la sintetasa ortogonal purificada exógenamente y el aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero con el ARNt ortogonal sintetizado por el organismo fuente del extracto celular. Preferentemente, los componentes ortogonales están dirigidos por promotores regulables, de modo que los niveles de síntesis puedan controlarse, aunque pueden usarse otras medidas como el control de la cantidad de los moldes de ADN relevantes por adición o por digestión específica.

[0064] Con el fin de evitar la degradación de la sintetasa ortogonal, la cepa bacteriana usada para producir los extractos tiene un gen *ompT* mutado (proteína T de la membrana externa). Preferentemente, *ompT* está mutado de tal modo que la función de proteasa es inactiva, pero todavía está presente la función de chaperona. Tales extractos tienen menores niveles de degradación de la sintetasa en relación con un extracto sin una mutación o delección tal.

[0065] La mezcla de reacción puede modificarse también para mantener un entorno oxidante para el plegamiento de la proteína, por ejemplo, mediante la adición de GSSG a la mezcla de reacción, en una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, normalmente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; la adición de GSH en una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, normalmente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM. También pueden incluirse componentes proteínicos como 100 µg/ml de DsbC o Skp. Opcionalmente, los extractos celulares se pretratan con yodoacetamida (IAM).

[0066] Las reacciones pueden ser de cualquier volumen, bien a pequeña escala, normalmente de al menos aproximadamente 1 µl y de no más de aproximadamente 15 µl, o en una reacción a mayor escala, en la que el volumen de reacción es de al menos aproximadamente 15 µl, normalmente de al menos aproximadamente 50 µl, más normalmente de al menos aproximadamente 100 µl y puede ser de 500 µl, 1.000 µl o superior. En la mayoría de los casos, las reacciones individuales no serán de más de aproximadamente 10 ml, aunque es posible llevar a cabo reacciones múltiples en paralelo. Sine embargo, en principio, las reacciones pueden llevarse a cabo a cualquier escala, siempre que se suministre suficiente oxígeno (u otro aceptor de electrones) cuando se necesite.

[0067] Además de los componentes anteriores, como el extracto acelular, el molde genético y los aminoácidos, pueden añadirse a la reacción materiales requeridos específicamente para la síntesis de proteínas. Estos materiales incluyen sales, ácido fólico, AMP cíclico, inhibidores de enzimas de degradación de proteínas o ácidos nucleicos, inhibidores de reguladores de la síntesis de proteínas, agentes de ajuste del(de los) potencial(es) de oxidación/reducción, tensioactivos no desnaturalizantes, componentes de tampones, espermina, espermidina, putrescina, etc.

[0068] Las sales incluyen preferentemente sales de potasio, magnesio y amonio (por ejemplo, de ácido acético o ácido glutámico). Una o más de dichas sales puede tener un aminoácido alternativo como contraión. Existe interdependencia entre las especies iónicas para una concentración óptima. Típicamente, estas especies iónicas se optimizan con respecto a la producción de proteína. Cuando se varía la concentración de un componente concreto del medio de reacción, la concentración de otro componente debe variarse como corresponde. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes, como nucleótidos y compuestos fuente de energía, pueden ajustarse simultáneamente de acuerdo con la variación de esos otros componentes. Además, los niveles de concentración de los componentes en el reactor pueden variarse con el tiempo. El agente de ajuste del potencial de oxidación/edución puede ser ditioneitol, ácido ascórbico, glutatión y/o sus formas oxidadas.

[0069] En un modo de operación semicontinuo, el exterior o la superficie externa de la membrana se pone en contacto con disoluciones predeterminadas que se cambian cíclicamente en un orden predeterminado. Estas disoluciones contienen sustratos como aminoácidos y nucleótidos. En este momento, el reactor opera en modo de

diálisis, de diafiltración discontinua o discontinuo con alimentación. Una disolución de alimentación puede suministrarse al reactor a través de la misma membrana o de una unidad de inyección separada. La proteína sintetizada se acumula en el reactor y después se aísla o purifica de acuerdo con el procedimiento habitual para la purificación de proteínas después de finalizar la operación del sistema. También pueden aislarse de manera
5 continua vesículas que contienen el producto, por ejemplo, mediante adsorción por afinidad a partir de la mezcla de reacción *in situ* o en un bucle de circulación, a medida que el fluido de la reacción se bombea para pasar por la matriz de adsorción.

[0070] Cuando hay un flujo de reactivos, la dirección del flujo de líquido puede ser perpendicular y/o tangencial a la membrana. El flujo tangencial es eficaz para reciclar el ATP y para evitar la obstrucción de la membrana y puede superponerse al flujo perpendicular. El flujo perpendicular a la membrana puede ser causado o efectuado por una bomba de presión positiva o una bomba de succión de vacío o mediante la aplicación de una presión transmembrana por cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. La disolución en contacto con la superficie externa de la membrana puede cambiarse cíclicamente y puede estar en un flujo tangencial constante con respecto a la membrana. El reactor puede agitarse interna o externamente con los medios de agitación adecuados.
10
15

[0071] Durante la síntesis de proteínas en el reactor, los medios de aislamiento de proteínas para el aislamiento selectivo de la proteína deseada pueden incluir una unidad rellena de partículas recubiertas con moléculas de anticuerpo u otras moléculas para la adsorción de la proteína deseada sintetizada. Preferentemente, los medios de aislamiento de las proteínas comprenden dos columnas para uso alternativo.
20

[0072] La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción puede medirse de diversas maneras: un procedimiento se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína concreta que se traduce. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad de la proteína es un sistema de ensayo de la luciferasa o un sistema de ensayo de la cloranfenicol-acetiltransferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida por la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que sea inactiva debido a un plegamiento incorrecto de la proteína o a la falta de otras modificaciones postraduccionales necesarias para la actividad de la proteína.
25

[0073] Otro procedimiento de medición de la cantidad de proteína producida en reacciones acopladas de transcripción y traducción *in vitro* es llevar a cabo las reacciones con una cantidad conocida de un aminoácido radiomarcado como ³⁵S-metionina, ³H-leucina o ¹⁴C-leucina y medir posteriormente la cantidad de aminoácido radiomarcado incorporado en la proteína nuevamente traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro*, incluidos los productos proteínicos truncados. La proteína radiomarcada puede separarse posteriormente en un gel de proteínas y mediante autorradiografía podrá confirmarse que el producto es del tamaño adecuado y que no se han producido productos proteínicos secundarios.
30
35

[0074] Además pueden proporcionarse kits para la práctica de los procedimientos sujeto. Tales kits pueden incluir extractos bacterianos para la síntesis de proteínas y la inserción dirigida de aminoácidos no naturales, por ejemplo, con ARNt y/o ARNt-sintetasa ortogonales o polinucleótidos que los codifiquen, tampones apropiados para reacciones en las que la fosforilación oxidativa está activada y vesículas. Los kits pueden incluir también vectores para la síntesis de proteínas, incluidos vectores para la expresión de las proteínas SRP y SR, en que los vectores pueden comprender sistemas promotores útiles en extractos bacterianos.
40
45

[0075] Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción completas de cómo realizar y usar la invención sujeto. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a las cifras usadas (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.), pero deberán tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta.
50

PARTE EXPERIMENTAL

[0076] Las reacciones de síntesis acelular de proteínas usadas como ejemplos fueron los sistemas Cytomim con glutamato y fosfato y PANOx-SP. Estos sistemas se modificaron para incorporar eficazmente un aminoácido no natural en una proteína diana. Los aminoácidos no naturales *o*-metil-L-tirosina, *p*-acetil-L-fenilalanina o *p*-azido-L-fenilalanina se introdujeron específicamente en un codón de parada ámbar mediante un par ortogonal ARNt^{Ty}/tirosina-sintetasa de *Methanococcus jannaschii*. Los aminoácidos no naturales están disponibles
55

comercialmente y las secuencias génicas se describen en la bibliografía científica (Wang y col. (2001) Science 292(5516): 498-500; Wang y col. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(1): 56-61; Chin y col. (2002) J. Am. Chem. Soc. 124(31): 9026-7; Farrell y col. (2005) Nat. Methods 2(5): 377-84; Liu y col. (2003) J. Am. Chem. Soc. 125(7): 1702-3). Estos aminoácidos no naturales se incorporaron en proteínas bacterianas solubles, proteínas secretadas de mamíferos con puentes disulfuro y proteínas de membrana. Esta plataforma de síntesis acelular de proteínas se desarrolló por modificación de las cepas celulares usadas para la preparación de los extractos, los protocolos de preparación de los extractos, las concentraciones de las proteínas auxiliares y las condiciones de la reacción acelular. La actividad de las proteínas diana puede verificarse mediante ensayos colorimétricos, de proliferación celular, de inmunoprecipitación y de transporte, según sea apropiado.

Ejemplo 1

Procedimientos para la expresión con gran rendimiento de proteínas complejas que contienen aminoácidos no naturales mediante síntesis acelular de proteínas

[0077] La proteína bacteriana cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT), las proteínas unidas por puentes disulfuro mGM-CSF y hGM-CSF y la proteína de membrana TetA se sintetizaron mediante los procedimientos de la invención. Para sintetizar las proteínas diana con grandes rendimientos, los genes molde se sintetizaron por PCR solapante a partir de oligonucleótidos optimizados para las concentraciones relativas de ARNt de *E. coli* (codones preferidos). Además, el extremo N de la secuencia génica se optimizó para promover el inicio de la traducción en nuestro sistema acelular (el extremo N se hizo rico en A-T). Los plásmidos con las proteínas naturales pK7CAT, pK7hGM-CSF, pK7hGM-CSFOPT (u optimizado adicionalmente para codones raros), pK7mGM-CSF y pK7TetA se desarrollaron por ligación de las secuencias optimizadas de las proteínas en el vector pK7 (véase la secuencia adjunta) en los sitios de restricción para *NdeI* y *SalI*. Entonces se llevó a cabo una reacción de PCR solapante y/o mutagénesis dirigida Quick-Change para insertar codones de parada ámbar (TAG) en posiciones de restos que no afectan significativamente al plegamiento o de los que se sabe que son sitios de glucosilación nativos. Esto llevó al desarrollo de pK7CAT_Y109STOP (SEQ ID NO:1), pK7hGM-CSF_N36STOP (SEQ ID NO:2), pK7hGM-CSFOPT_N36STOP (SEQ ID NO:3), pK7mGM-CSF_N75STOP (SEQ ID NO:4), pK7TetA_D34STOP (SEQ ID NO:5) y pK7TetA_Q182STOP (SEQ IN NO:6). {PREGUNTA: ¿van a incluirse estas secuencias en la solicitud? Parece que se eliminan al final} Los genes estaban bajo el control de los promotores y terminadores de T7. Los plásmidos se prepararon después de su transformación en células químicamente competentes XL1-Blue y se purificaron mediante un kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.).

[0078] Los componentes de la reacción acelular Cytomim con glutamato y fosfato usados para la incorporación de un aminoácido no natural incluyen 13,3 µg/ml de plásmido molde, AMP 1,2 mM, CMP 0,86 mM, GMP 0,86 mM, UMP 0,86 mM, 34 µg/ml de ácido fólico, 170,6 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, el aminoácido no natural a una concentración de 0,5 a 10 mM, de 1 a 200 µg/ml de aminoacilsintetasa, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1,5 mM, oxalato de sodio 4 mM, ditiotreitol 1 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, glutamato de magnesio 8 mM, fosfato de potasio 10 mM, pH 7,2, L-[¹⁴C]-leucina 12 µM, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7, de 0,001 a 0,4 volúmenes del extracto S30 de *E. coli* y de 0 a 0,41 volúmenes de una disolución de vesículas de membrana interna.

[0079] La ARN-polimerasa de T7 se prepara a partir de la cepa BL21 (pAR1219) de *E. coli*, según describen Grodberg y Dunn (1988) J. Bacteriol. 170(3): 1245-53. El extracto S30 de *E. coli* puede prepararse a partir de cualquiera de las cepas siguientes: KC6 (A19ΔtonAΔtnaAΔspeAΔendAΔsdaAΔsdaBΔgshA met⁺) (Calhoun y Swartz (2005) Biotechnol. Prog. 21(4): 1146-53), KGK10 (A19ΔspeAΔtnaAΔtonAΔendAΔsdaAΔsdaBΔgshAΔgor met⁺ que puede incluir TrxB-HA), ARG1 (A19ΔtonAΔtnaAΔspeAΔendAΔsdaAΔsdaBΔgshA met⁺ OmpTD83A), ARG2 (A19ΔspeAΔtnaAΔtonAΔendAΔsdaAΔsdaBΔgshAΔgor met⁺ OmpTD83A que puede incluir TrxB-HA) (el procedimiento de modificación genómica se describe a continuación) y MCJ29 (A19ΔspeAΔtnaAΔompTΔptrCΔdegP-ΔtonAΔendA met⁺), cultivadas de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación (Zawada y Swartz (2006) Biotechnol. Bioeng. 94: 618), y se prepara según se describe en Liu y col. (2005) Biotechnol. Prog. 21(2): 460-5. Para un experto en la técnica, es posible construir cualquier otra cepa celular y usarla para generar un extracto celular que podría usarse en este sistema acelular. También se generaron extractos con los productos del plásmido pK7tRNAmj o del plásmido con la sintetasa (pK70MeTyr) expresados durante el crecimiento celular. Estos plásmidos se construyeron con la secuencia génica apropiada entre un promotor constitutivo (*lpp*) o controlable (*lac*, *ara*, etc.) y un terminador *rrmC* o T7 (véase pK7tRNAmj).

[0080] El sistema PANOX-SP-AAAnn se eligió como sistema energético. La reacción incluyó glutamato de

potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, ATP 0,6 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,43 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1,0 mM, 17 µg/ml de ácido folínico, 85,3 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, el aminoácido no natural a una concentración de 0,5 a 10 mM, de 0 a 200 µg/ml de aminoacilsintetasa, L-[U-¹⁴C]-leucina 10 µM, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, 5 coenzima A (CoA) 0,27 mM, 13,3 µg/ml de plásmido molde, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7 y de 0,01 a 0,40 volúmenes del extracto S30 de *E. coli*. Las fuentes del extracto celular se describen anteriormente. El sistema PANox-SP-AAAnn incluye también glutamato de magnesio 16 mM, fosfoenolpiruvato 33 mM y oxalato de sodio 2,7 mM.

10 **[0081]** Las proteínas activas sintetizadas para demostrar la producción de proteínas con puentes disulfuro modificadas fueron GM-CSF murina (mGM-CSF) y GM-CSF humana (hGM-CSF). Estas reacciones fueron típicamente reacciones PANox-SP-AAAnn con un volumen total de 30 µl y complementadas con tampón de glutatión oxidado (GSSG) 1-16 mM, tampón de glutatión reducido (GSH) 1-4 mM y aproximadamente de 0 a 200 µg/ml de DsbC o Skp. Adicionalmente, los extractos celulares se pretrataron con yodoacetamida (IAM) 0-2 mM. Las proteínas
15 DsbC y Skp necesarias se prepararon por expresión en exceso y purificación a partir de la cepa BL21(DE3) (Yin y Swartz (2004) Biotechnol. Bioeng. 86: 188-95). En las reacciones que requirieron el tratamiento con yodoacetamida (IAM), primeramente se añadió un pequeño volumen de IAM concentrada al recipiente de reacción. A continuación, un volumen mucho mayor del extracto S30 se mezcló rápida y completamente con el pequeño volumen de IAM. El extracto se incubó entonces con la IAM durante 30 min a temperatura ambiente antes de usarlo en la reacción
20 acelular.

[0082] Las reacciones combinadas de transcripción y traducción se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 1,5 ml o en placas de Petri a una temperatura de 25 a 37°C durante 3 a 24 h según se indica.

25 **[0083]** Las estrategias para la incorporación de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a: (I) la adición de la sintetasa ortogonal y el ARNt ortogonal purificados a la reacción acelular, (II) la adición de la sintetasa ortogonal purificada, pero con el ARNt ortogonal transcrito durante la reacción acelular, (III) la generación de un extracto celular a partir de células que expresan la sintetasa ortogonal y/o el ARNt ortogonal (con adición a la reacción acelular, en su caso, del factor purificado no expresado en el extracto celular) y (IV) el desarrollo de una
30 metodología secuencial de expresión de proteínas.

Ejemplo 2

Sintetasa purificada y transcripción de ARNt purificado/controlado en la reacción acelular

35 **[0084]** Las estrategias de incorporación de aminoácidos no naturales I y II se describen mediante este ejemplo. La estrategia I fue la adición de la sintetasa ortogonal purificada y del ARNt ortogonal purificado a la reacción acelular y la estrategia II fue la adición de la sintetasa ortogonal purificada a la mezcla de reacción acelular, pero con el ARNt ortogonal transcrito durante la reacción acelular.

40 **[0085]** Para la estrategia I, se llevó a cabo la transcripción *in vitro* del ARNt a partir de moldes lineales. Para una reacción de 1 ml, esto requirió: 200 µl de tampón de transcripción 5x (Tris-HCl 200 mM, pH 7,9, DTT 100 mM, MgCl₂ 125 mM), 80 ó 160 µl de mezcla de NTP (cada NTP respectivamente 25 mM), 10 µl de ³H-UTP 24 µM, 50 µl de molde de ADN lineal purificado producido por PCR (detrás de un promotor de T7 y purificado con un kit de
45 purificación de PCR QIAquick) de aproximadamente 0,1 mg/ml, 25 µl de ARNasa Out de 40 U/ml, 580 ó 505 µl de agua, 10 µl de pirofosfatasa de 1 U/ml, 20 µl de espermidina 100 mM y 20 µl de ARN-polimerasa de T7 de 5 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 a 3,5 h. Después de la reacción, el ADN se degradó por la adición de 5 µl de ARNasa y una incubación de 10 min a temperatura ambiente. La purificación se llevó a cabo mediante extracción con fenol/cloroformo. En la estrategia II, la casete génica de expresión del ARNt (incluidos el
50 promotor *lpp* y el terminador *rrnC*) se clonó en un sitio para *Pst*I en el vector pK7 (véase la secuencia adjunta).

[0086] En este ejemplo se eligió la incorporación de *o*-metil-L-tirosina en pK7mGM-CSF_N75STOP. Para llevar a cabo este experimento, también fue necesario expresar y purificar un mutante de la tirosina-sintetasa procedente de *Methanococcus jannaschii*. El gen de la tirosina-sintetasa se clonó en el vector pK7 y a su extremo C se le añadió una etiqueta de hexahistidina. Las mutaciones necesarias en la sintetasa para permitir la sustitución con *o*-metiltirosina han sido publicadas por Wang y col., cita anterior. Las células BL21 DE3 se transformaron con el plásmido con la sintetasa mutante, se cultivaron en el medio LB y se indujeron a una DO de 0,6 con IPTG 1 mM. Las células se recolectaron a una DO de 3 y se centrifugaron a 7.140 x g durante 30 min. Después, las células se resuspendieron y se lavaron en el tampón S30 (Tris-acetato 10 mM, pH 8,2, acetato de magnesio 14 mM, acetato de

potasio 60 mM) tres veces sucesivas. A continuación, el sedimento de células se resuspendió y las células se lisaron mediante homogeneización en un solo paso (a más de 137,9 MPa). Las células lisadas se centrifugaron después a 20.000 x g durante 30 min. Seguidamente, el sobrenadante se cargó en una columna de Ni-NTA de 1 ml (Amersham Biosciences), equilibrada con imidazol 10 mM, tampón de fosfato 50 mM (pH 8,0) y NaCl 300 mM. La columna se lavó con 30 ml de imidazol 25 mM en el mismo tampón y se eluyó con imidazol 250 mM en el mismo tampón. A continuación, los productos purificados se concentraron con unidades de filtración para centrifugación Amicon Ultra-15 (corte de peso molecular, 5.000) y después se resuspendieron y reconcentraron en tampón de fosfato salino (PBS).

10 **[0087]** En este ejemplo se usó el sistema PANOX-SP estándar, que mantiene un entorno oxidante necesario para la formación y la isomerización de los puentes disulfuro y contiene los siguientes componentes: glutamato de potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de magnesio 16 mM, fosfoenolpiruvato 33 mM, oxalato de sodio 2,7 mM, ATP 0,6 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,43 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1,0 mM, 17 µg/ml de ácido fólico, 85,3 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2
15 mM, L-[U-¹⁴C]-leucina 10 µM, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, 13,3 µg/ml de pK7mGM-CSF_N75STOP, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7, tampón de glutatión oxidado (GSSG) 4 mM, tampón de glutatión reducido (GSH) 1 mM, 100 µg/ml de DsbC y 0,24 volúmenes del extracto S30 de *E. coli* KC6, pretratado durante 30 min con yodoacetamida (IAM) 1 mM. El extracto se preparó según se describe en Zawada y Swartz (2006) *Biotechnol. Bioeng.* 94(4): 618-24 y Liu y col., cita anterior.

20 **[0088]** La proteína sintetizada con el sistema PANOX-SP descrito anteriormente después de 3 h de síntesis a 37°C se cuantificó por medición de la radiactividad precipitable con TCA mediante un contador de centelleo líquido (LS3801, Beckman Coulter, Inc.) y un autorradiograma tras electroforesis en SDS-PAGE (gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% en el tampón MES). Mediante la estrategia I, la máxima cantidad de mGM-CSF producida, sintetizada
25 acelularmente después de n = 9 reacciones (con o-metil tirosina), fue de aproximadamente 50 ng/ml, según se cuantifica a partir de la figura 1 y de acuerdo con los resultados del recuento de centelleo. Según se muestra en la figura 1, la cantidad de producto proteínico modificado producido se encontró en el límite inferior de detección para estos ensayos. La estrategia II dio rendimientos igualmente bajos al producir 20 ± 5 ng/ml en n = 9 reacciones acelulares PANOX-SP.

30

Ejemplo 3

Expresión *in vivo* del ARNt y la sintetasa ortogonales

35 **[0089]** El entorno de expresión acelular PANOX-SP estándar usado en este ejemplo contiene los siguientes componentes: glutamato de potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de magnesio 16 mM, fosfoenolpiruvato 33 mM, oxalato de sodio 2,7 mM, ATP 0,6 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,43 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1,0 mM, 17 µg/ml de ácido fólico, 85,3 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, L-[U-¹⁴C]-leucina 10 µM, dinucleótido de nicotinamida y adenina
40 (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, 13,3 µg/ml de pK7CAT_Y109STOP, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7 y 0,24 volúmenes del extracto S30 de *E. coli* KC6 que contiene el ARNt y la ARNt sintetasa ortogonales expresados *in vivo*. Después de la transformación del plásmido con la ARNt y la sintetasa ortogonales (plásmido pDule, según se publica en Wang y col., cita anterior) en células KC6 químicamente competentes, el extracto se preparó según se describe en Zawada y Swartz, cita anterior, y Liu y col., cita anterior, (con las modificaciones
45 descritas a continuación) y se recogió a una DO de 3.

[0090] La estrategia III implicó la generación de un extracto celular a partir de las cepas celulares modificadas que expresaban la sintetasa ortogonal y el ARNt ortogonal. Inicialmente se siguió el procedimiento descrito por Zawada y col. *Fermentation Biotechnology*, ed. S. B. 2003, Washington, DC: ACS Press, 142-156 para llevar a cabo
50 la fermentación. Sin embargo, las velocidades de crecimiento de las cepas de *E. coli* A19 auxótrofas para fenilalanina y de las cepas celulares KC6 en medios definidos fue de aproximadamente 0,5 a 0,6 h⁻¹. Esto resultó en la producción de un extracto celular que no mostraba mejoras significativas con respecto a las estrategias I y II (representado en la figura 2) en cuanto a la producción de proteína CAT modificada en nuestro sistema acelular. El cambio al medio de cultivo 2x YTPG aumentó la velocidad de crecimiento hasta 0,7 y 0,9 h⁻¹ a 37°C. Después de
55 esta mejora de la velocidad de crecimiento, se llevó a cabo la caracterización analítica de los extractos. Por medio de ensayos analíticos, se encontró que la concentración total de proteína en el extracto celular era aceptable (aproximadamente 42 mg/ml, determinada por el ensayo de Bradford), la concentración de aminoácidos naturales era baja (<0,2 mM, cuantificada mediante un sistema de HPLC Dionex) y la concentración de vesículas era variable (de 0,5 a 3,5 mg/l, medida por medio de un ensayo de fosfato después de la extracción con cloroformo) (Chen y col.

(1956) Anal. Biochem. 28: 1756-1758 y Fiske y Subbarow (1925) J. Biol. Chem. 66: 374-389). Durante la caracterización del sistema se encontró que el aumento de la concentración de vesículas contribuía a generar mayores cantidades de la proteína con un aminoácido no natural. Según se muestra en la figura 2, el rendimiento de la síntesis acelular de la proteína CAT, que incluía *o*-metiltirosina 4 mM, aumentó hasta aproximadamente 17 µg/ml de CAT activa como resultado del desarrollo del sistema. El autorradiograma mostrado en la figura 2 (generado a partir de un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% sometido a electroforesis en el tampón MES) indica un aumento de la concentración del producto proteínico de longitud completa con el aminoácido no natural y una disminución de la concentración del producto proteínico truncado.

10 Ejemplo 4

Expresión *in vivo* del ARNt y adición de la sintetasa purificada

[0091] Al aumentar la concentración de la sintetasa y el ARNt ortogonales en la reacción acelular, aumentó la acumulación del producto acelular y disminuyó el truncado de la proteína en el codón de parada ámbar. Se razonó que las mayores concentraciones pueden contrarrestar cualquier proteasa o nucleasa que pueda estar limitando las concentraciones de la sintetasa y el ARNt ortogonales y resultan en un aumento de la producción de los productos proteínicos modificados.

[0092] En esta estrategia se alcanzaron y se controlaron elevadas concentraciones de ARNt ortogonal (mediante un vector pDule modificado, del que se había eliminado el gen de la ARNt sintetasa) durante la producción del extracto celular (con el uso de medios definidos). Sin embargo, para minimizar el estrés sobre la célula, la sintetasa ortogonal se produjo separadamente. Para este experimento se produjo y se purificó el mutante de la tirosina-sintetasa de *Methanococcus jannaschii* que incorporaba fácilmente *p*-azidofenilalanina. Las mutaciones necesarias han sido publicadas por Chin y col., cita superior. Este gen se insertó detrás de un promotor de T7, al extremo C se le unió una etiqueta de hexahistidina y el plásmido resultante se transformó en la cepa celular BL21 DE3 pLys. Las células se cultivaron en el medio LB y se indujeron a una DO de 0,6 con IPTG 1mM. El cultivo se recolectó a una DO de 3 y se centrifugó a 7.140 x g durante 30 min. Después, las células se resuspendieron y se lavaron en el tampón S30 (Tris-acetato 10 mM, pH 8,2, acetato de magnesio 14 mM, acetato de potasio 60 mM) y se centrifugaron tres veces sucesivas. A continuación, el sedimento de células se resuspendió y las células se lisaron mediante homogeneización en un solo paso. Las células rotas se centrifugaron después a 20.000 x g durante 30 min. El sobrenadante se recogió y se incubó con ADNasa durante 30 min a temperatura ambiente. Después, el sobrenadante se cargó en una columna de Ni-NTA de 1 a 5 ml equilibrada con imidazol 10 mM, tampón de fosfato 50 mM (pH 8,0) y NaCl 300 mM. A continuación, la columna se lavó con 30 ml de imidazol 25 mM en el mismo tampón y se eluyó con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Los productos purificados se concentraron con unidades de filtración para centrifugación Amicon Ultra-15 (corte de peso molecular, 5.000) y se dializaron con tubos de diálisis con un corte de peso molecular de 7.000 frente a tampón de fosfato salino (PBS).

[0093] Separadamente, la cepa celular KC6 (también podrían haberse usado las cepas KGK10, MCJ29, ARG1 y ARG2 descritas previamente) con el plásmido pK7tRNAmj se cultivó en un fermentador de 4 ó 10 litros en medio definido. La fermentación se recolectó a una DO de 3 y el extracto se preparó mediante un procedimiento abreviado descrito por Liu y col., cita anterior. Este procedimiento se modificó de las maneras siguientes: (1) no se realizó ninguna dilución con el tampón S30 después de las centrifugaciones de homogeneización y (2) solo se llevó a cabo una etapa de diálisis. En algunos casos, la centrifugación final después de la reacción de extensión de 90 min puede omitirse para conservar una mayor concentración de vesículas. Los procedimientos para determinar la concentración de las vesículas se obtuvieron de Chen y col., cita anterior, y de Fiske y Subbarow, cita anterior.

[0094] La reacción PANOX-SP-AAAnn llevada a cabo en este ejemplo contenía glutamato de potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, ATP 0,6 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,43 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1,0 mM, 17 µg/ml de ácido folínico, 85,3 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, el aminoácido no natural a una concentración de 4 mM, de 0 a 167 µg/ml de aminoacilsintetasa, L-[U-¹⁴C]-leucina 10 µM, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, 13,3 µg/ml de pK7CAT_Y109STOP, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7 y 0,24 volúmenes del extracto S30 de *E. coli*. Las fuentes del extracto celular se describen anteriormente. El sistema PANOX-SP-AAAnn incluye también glutamato de magnesio 16 mM, fosfoenolpiruvato 33 mM y oxalato de sodio 2,7 mM. Estas reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante los tiempos indicados.

[0095] En la estrategia IV, la expresión controlada del ARNt (a partir de un plásmido pDule modificado, carente del gen de la ARNt sintetasa) durante la preparación del extracto, el protocolo modificado de preparación del

extracto y la adición de *p*-azidofenilalanina-sintetasa al sistema de reacción acelular PANOX-SP-AAn resultaron en un aumento de los rendimientos de la proteína modificada. Según se observa en la figura 3A, el aumento de la concentración de la sintetasa aumentó los rendimientos de CAT activa de longitud completa aproximadamente 10 veces por encima de los mostrados en la figura 2 (más de 125 µg/ml). Según se determinó por medio de un ensayo colorimétrico, del 90 al 100% de la concentración de CAT soluble corresponde a proteína activa plegada correctamente. Los cambios en el protocolo de preparación del extracto contribuyeron a proporcionar mayores concentraciones del ARNt ortogonal y de las vesículas, las cuales son esenciales para una síntesis de proteínas modificadas prolongada durante más de 8 h (véase la figura 3B). Esto asegura un ruta de fosforilación oxidativa activa, lo que resulta evidente (véase la figura 3C) por la continua formación de producto que sigue al consumo inicial de PEP durante las primeras horas de la síntesis de proteínas.

Ejemplo 5

Mejora de los extractos celulares para la incorporación de aminoácidos no naturales

15

[0096] Aunque en nuestro sistema combinado de transcripción/traducción se produjeron proteínas secretadas activas bacterianas y de mamíferos, se buscaron mayores rendimientos. Se encontró que uno de los componentes limitantes es la concentración de la sintetasa ortogonal. Una razón para que este componente esté limitado se muestra en el carril 1 de la figura 4. Este es el producto proteínico *p*-azidofenilalanina-ARNt-sintetasa ortogonal producido en la reacción de síntesis acelular PANOX-SP estándar a 37°C durante 3 h. Las condiciones de la reacción se han descrito previamente en el ejemplo 2 (los productos se marcaron con L-[U-¹⁴C]-leucina). La sintetasa ortogonal parece ser sufrir degradación proteolítica. Esto se verificó posteriormente mediante la adición de más de 500 µg/ml de sintetasa ortogonal marcada con L-[U-¹⁴C]-leucina al extracto celular de KC6. Después de una incubación de 6 h a 37°C, no pudo detectarse la sintetasa de longitud completa por autorradiografía. Mediante el control de la degradación de la sintetasa, se intentó aumentar la producción de proteína.

[0097] Se construyeron nuevas cepas celulares usando cepas celulares generadas previamente en el laboratorio de Swartz (KGK10 y KC6), de las que se ha demostrado que minimizan las concentraciones de disulfuro-reductasa y estabilizan las concentraciones de aminoácidos. Estas cepas celulares se modificaron por delección o mutación del gen *ompT* que codifica la proteína T de la membrana externa, de modo que el producto génico estuviera ausente en el extracto celular o aún presente, pero inactivo como proteasa aunque activo como chaperona.

[0098] El mutante MCJ29 se generó según describe Jewett en su tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química, 2005, Universidad de Stanford, Stanford, pág. 240. Los mutantes ARG1 y ARG2 se generaron mediante sustitución génica con el uso de vectores pKO [28] para construir plásmidos para intercambio de alelos. Se amplificaron por PCR fragmentos de aproximadamente 1 kb flanqueantes del gen *ompT* que había de sustituirse a partir de ADN genómico con los cebadores ompTNo y ompTCo (basados en las secuencias obtenidas de la página de internet de G. M. Church). El producto de PCR del gen *ompT* natural se clonó en el vector pKOV mediante las enzimas de restricción adecuadas *NotI* y *SalI*. Después se introdujo la mutación deseada D83A en la secuencia del gen *ompT* natural mediante el kit de mutagénesis dirigida QuickChange, con los cebadores ompTD83AmutF (SEQ ID NO:11) (GTGGCAATATGGTCGCTCAGGACTGGATGG) y mutR (SEQ ID NO:12) GGTAGGTCAAGGACTCGCTGGTATAACGGTG). Los alelos mutantes clonados en el vector de sustitución génica pKOV se introdujeron por electroporación en KC6 (para generar finalmente ARG1) o KGK10 (para generar finalmente ARG2) y se permitió a las células recuperarse durante una hora a 30°C. Las células se sembraron en placas precalentadas de LB con cloranfenicol y se incubaron a 42°C. Para medir la frecuencia de integración, las células sometidas a electroporación también se sembraron en placas de LB con cloranfenicol a 30°C. Se seleccionaron de una a cinco colonias de las placas de 42°C que se transfirieron a 1 ml de caldo LB, se realizaron diluciones en serie e inmediatamente se llevó a cabo la siembra en placas con el 5% p/v de sacarosa a 30°C. Las colonias de las placas con el 5% de sacarosa se analizaron en placas de cloranfenicol a 30°C para comprobar la pérdida del vector de sustitución. En resumen, se buscaron colonias resistentes a sacarosa y sensibles a cloranfenicol para el suceso de sustitución mediante la "selección de colonias" y la elección se confirmó por PCR con los cebadores ompT5' y ompTD83A. El resultado fueron las nuevas cepas celulares ARG1 y ARG2 que habrían de contener la mutación inactivadora D83A en el gen *ompT*.

55

[0099] En la figura 4 se muestra el análisis mediante autorradiografía de la acumulación de sintetasa ortogonal después de su expresión en una reacción de síntesis acelular de proteínas. El autorradiograma se reveló a partir de un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10%, sometido a electroforesis en el tampón MES. La *p*-azidofenilalanina-ARNt-sintetasa sufre una intensa degradación por proteasas en el extracto de células KC6. La sintetasa no se degrada

cuando se usan las cepas celulares mutantes ARG1, ARG2 o MCJ29 para producir los extractos celulares (se proporciona un solo ejemplo, ya que todos los resultados fueron similares). Cuando se incorpora la delección o la mutación de *ompT* en las cepas celulares KC6 o KGK10, la sintetasa producida nuevamente es estable.

- 5 **[0100]** Carril 2, estas modificaciones genómicas en las cepas celulares usadas para preparar los extractos celulares prácticamente eliminaron la degradación de la *p*-azidofenilalanina-ARNt-sintetasa producida en una reacción PANOX-SP estándar. El mismo resultado se observó cuando la *p*-acetilfenilalanina-ARNt-sintetasa se incubó con extractos de ARG1 y MCJ29 a 37°C durante 6 h.

10 **Ejemplo 6**

Elevada producción de proteínas bacterianas con aminoácidos no naturales en una plataforma acelular

- [0101]** Aunque podría haberse usado cualquiera de los sistemas energéticos alternativos mencionados
15 previamente, se eligió el sistema PANOX-SP-AAAnn para ejemplificar el aumento de la producción de una proteína con un amino ácido no natural. Específicamente, la reacción acelular para este ejemplo incluyó glutamato de potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, ATP 0,6 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,43 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1,0 mM, 17 µg/ml de ácido folínico, 85,3 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, el aminoácido no natural a una concentración de 2 mM, 150 µg/ml de aminoacil-
20 ARNt-sintetasa, L-[U-¹⁴C]-leucina 10 µM, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, 13,3 µg/ml de plásmido molde, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7 y 0,29 volúmenes del extracto S30 de *E. coli* (preparado con una de las líneas celulares especificadas) que contenía el ARNt ortogonal de *Methanococcus jannaschii*. Las fuentes del extracto celular se describen anteriormente. El sistema PANOX-SP-AAAnn incluye también glutamato de magnesio 16 mM, fosfoenolpiruvato 33 mM y oxalato de sodio 2,7 mM.

- 25 **[0102]** La figura 5 muestra los aumentos significativos (en comparación con los datos mostrados en la figura 2) en la producción de CAT con *p*-azidofenilalanina o *p*-acetilfenilalanina. Las estrategias I y II muestran rendimientos similares a los de la figura 1 para mGM-CSF. De manera similar, la estrategia IIa verifica la mejora en la producción de proteína modificada mostrada en el ejemplo 3, figura 2. Adicionalmente, la estrategia IIIb verifica la reproducibilidad y la limitación de la sintetasa mostradas en la figura 3. Por último, con el uso de la composición mencionada en este ejemplo, la estrategia IIIc demuestra que con la optimización de las relaciones entre los componentes del sistema PANOX-SP-AAAnn (aminoácido no natural, sintetasa ortogonal y extracto celular), la optimización del entorno de la reacción (30°C duran te 8 h), el uso de cepas celulares mutadas para la preparación de los extractos (ARG1 y ARG2) y la modificación del procedimiento por el que estos se producen y la incorporación
35 del plásmido pK7tRNAmj en las nuevas cepas celulares, un nuevo sistema acelular de base bacteriana produce de dos a tres veces más proteína modificada (más de 300 µg/ml) con *p*-azidofenilalanina o *p*-acetilfenilalanina. Estos rendimientos fueron de aproximadamente el 75% de la proteína CAT natural producida en una reacción acelular similar (sin la adición de aminoácidos no naturales). Además, según se observa en la figura 5, el análisis de los productos proteínicos de la estrategia IIIc mediante autorradiografía mostró que el producto de la reacción acelular
40 es fundamentalmente una proteína de longitud completa que contiene un aminoácido no natural.

Ejemplo 7

Síntesis de proteínas secretadas bioactivas de mamíferos que contienen un aminoácido no natural

- 45 **[0103]** Dado el diseño de un nuevo sistema acelular de base bacteriana y el aumento de los rendimientos de CAT, se consideró apropiado comenzar a incorporar aminoácidos no naturales en una serie de proteínas complejas diferentes que no habían sido producidas con aminoácidos no naturales. Los ejemplos de proteínas complejas mostradas en este informe son mGM-CSF, hGM-CSF y la proteína de membrana TetA. Una plataforma tecnológica semejante puede extenderse a un gran número de proteínas complejas que no se muestran como ejemplos, incluidas, pero sin limitarse a proteínas de fusión, fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos de anticuerpos Fab y anticuerpos de longitud completa.

- [0104]** Después de reacciones acelulares PANOX-SP-AAAnn similares a aquellas descritas en el ejemplo 6, se
50 determinaron los rendimientos de proteína activa a partir de pK7mGM-CSF_N75STOP, pK7hGM-CSF_N36STOP o pK7hGM-CSFOPT_N36STOP por medio de ensayos basados en la proliferación celular. Para asegurar un plegamiento correcto, el sistema PANOX-SP-AAAnn descrito en el ejemplo 6 se modificó para mantener un entorno de plegamiento oxidante mediante la adición a la mezcla de reacción de GSSG 4 mM, GSH 1 mM y aproximadamente 100 µg/ml de DsbC. Además, los extractos celulares se pretrataron con yodoacetamida (IAM) 1 mM. Primeramente

se añadió un pequeño volumen de IAM concentrada al recipiente de reacción. A continuación, un volumen mucho mayor del extracto S30 se mezcló rápida y completamente con el pequeño volumen de IAM. El extracto se incubó con la IAM durante 30 min a temperatura ambiente, antes de usarlo en la reacción acelular. Para preparar el extracto se usó la cepa celular KC6 que contenía el plásmido pDule modificado (sin el gen de la ARNt-sintetasa) y las reacciones acelulares se llevaron a cabo a 30°C durante 6 h.

[0105] La actividad biológica de la proteína GM-CSF murina y humana se ensayó con el uso de una línea celular dependiente de mGM-CSF o de hGM-CSF, NFS-60 o TF1 (adquiridas de la colección ATCC). Las proteínas solubles expresadas acelularmente y los estándares comerciales de GM-CSF murina y humana se diluyeron en serie por triplicado. Con el fin de analizar su capacidad para estimular la proliferación celular, a los productos acelulares y a los estándares de GM-CSF diluidos en serie se les añadieron volúmenes iguales del medio RPMI con FCS al 10% y el cultivo celular en fase logarítmica. Las células se sembraron a una concentración de 5.000 células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano. Después de la incubación a 37°C con CO₂ al 5% durante 16-20 h para las células NSF-60 y de 36 a 48 h para las células TF1, se añadieron 50 µl de [³H]-timidina a cada pocillo a una concentración final de 247,9 kBq/ml y la proliferación se monitorizó por la incorporación de [³H]-timidina. Tras 8-10 h de incubación a 37°C con CO₂ al 5%, las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se lavaron. La incorporación de [³H]-timidina se midió con un contador de centelleo Wallach 1450 Microbeta (Perkin Elmer Life Sciences).

[0106] Los rendimientos del sistema de síntesis acelular de proteínas PANox-SP-AAAnn para proteínas con puentes disulfuro modificadas se muestran en la figura 6. Adicionalmente, las proteínas producidas están plegadas correctamente y son biológicamente activas, según se muestra en los datos de bioactividad (procedimiento descrito anteriormente) representados en la figura 7. Estos resultados muestran que el nuevo sistema acelular produce proteínas con puentes disulfuro activas que contienen un aminoácido no natural, con una actividad de GM-CSF comparable a la producida en un sistema *in vivo*. Aquellas reacciones acelulares que no contenían ARNt ortogonal, no contenían sintetasa o no contenían aminoácidos no naturales no generaron ninguna proteína que estimulara la proliferación celular. Estos datos sugieren también que las construcciones de proteínas de fusión con GM-CSF o un estimulante inmunitario similar en los extremos N o C podrían tener incorporado un aminoácido no natural y producirse por medio de esta nueva plataforma de síntesis acelular de proteínas.

30

Ejemplo 8

Incorporación de un aminoácido no natural en una proteína de membrana

[0107] El uso del sistema acelular con glutamato y fosfato para la producción de proteínas de membrana correctamente plegadas es único en el sentido de que también requiere la preparación de una disolución de vesículas mediante un procedimiento adaptado de Muller y Blobel (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(24): 7737-41 y Osborn y col. (1972) J. Biol. Chem. 247(2): 3962-72. Las células KC6 se resuspendieron y se lavaron en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM. El sedimento final de células se resuspendió en 1 ml del mismo tampón por gramo de células y se incubó en hielo con 0,2 mg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina durante 15 min. Después de la incubación, la disolución de células se pasó tres veces a través de un homogeneizador a 137,9 MPa. Las células enteras y los restos celulares se eliminaron mediante dos centrifugaciones de 20 min cada una a 30.000 x g. A continuación, las vesículas se recogieron por ultracentrifugación (154.000 x g, 1,5 h) y se volvieron a sedimentar a través de 0,5 mUg de células de una disolución que contenía sacarosa 250 mM en el tampón H (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 5 mM) a 231.000 x g durante una hora. Estas vesículas purificadas crudamente se resuspendieron en sacarosa al 20% (p/p) y se cargaron en un gradiente escalonado con capas del 50%, el 45%, el 40%, el 35%, el 30% y el 25% (p/p) de sacarosa. Después de una ultracentrifugación durante 24 h a 114.000 x g, se recogieron las fracciones que contenían las vesículas de membrana interna. Estas vesículas se sedimentaron y finalmente se resuspendieron a una concentración elevada (1-2 mg/ml) en HEPES-KOH 20 mM, pH 7,2, KCl 60 mM, DTT 1 mM.

[0108] Una vez generados los componentes acelulares, se usó el sistema combinado de transcripción/traducción con glutamato y fosfato para sintetizar la proteína de membrana TetA con un aminoácido no natural (*p*-azidofenilalanina) y comprobar si podría plegarse correctamente en las membranas de las vesículas. Los componentes de la reacción acelular con glutamato y fosfato usados para incorporar un aminoácido no natural incluyen 13,3 µg/ml de pK7TetA_D34STOP o pK7TetA_Q182STOP (véanse las secuencias adjuntas), AMP 1,2 mM, CMP 0,86 mM, GMP 0,86 mM, UMP 0,86 mM, 34 µg/ml de ácido fólico, 170,6 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, el aminoácido no natural a una concentración de 4 mM, 75 µg/ml de aminoacilsintetasa, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM,

putrescina 1 mM, espermidina 1,5 mM, oxalato de sodio 4 mM, ditiotreitól 1 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, glutamato de magnesio 8 mM, fosfato de potasio 10 mM, pH 7,2, [¹⁴C]-leucina 12 μM, 0,1 mg/ml de ARN-polimerasa de T7, 0,29 volúmenes del extracto S30 de *E. coli* y 0,21 volúmenes de la disolución de vesículas de membrana interna.

5

[0109] A partir del autorradiograma de la figura 8A, está claro que puede producirse la proteína de membrana TetA (42,5 kDa) con un aminoácido no natural. Esto tuvo lugar después de 6 h de síntesis acelular de proteínas a 37°C. La proteína sintetizada total se cuantificó por medición de la radiactividad precipitable con TCA con un contador de centelleo líquido. Esta se calculó como de 226 y 349 μg/ml para las proteínas TetA mutantes generadas a partir de los plásmidos pK7TetA_D34STOP y pK7TetA_Q182STOP. Antes de proseguir el análisis, la reacción se purificó crudamente por diálisis en una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular de 100 kDa, frente a 500-1.000 volúmenes de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, con cambio de tampón tres veces después de la diálisis durante al menos 3 h cada vez.

10

[0110] Para cuantificar la cantidad de proteína insertada en las vesículas de *E. coli*, los productos de la reacción acelular dializados se sometieron a un ensayo de flotación en sacarosa. El producto dializado de la reacción acelular se mezcla con una disolución densa de sacarosa y se carga en el fondo de un gradiente de sacarosa de tres etapas. Las densidades de las capas se eligen de modo que, después de la ultracentrifugación, (16 h, 237.000 x g) los agregados de la proteína incorrectamente plegada (con una densidad $\rho \sim 1,3$ g/ml) permanecen en la capa del fondo, mientras que las vesículas más ligeras ($\rho \sim 1,13-1,25$ g/ml, dependiendo de cuánta proteína se haya insertado) flotan en la interfase sobre la segunda capa. La figura 8 muestra la distribución de la TetA radiomarcada después del análisis de flotación en sacarosa. En todos los gradientes se añadió urea 6 M para reducir la asociación inespecífica de la proteína sintetizada con las membranas. Cuando hay vesículas presentes en la reacción, se observa que la mayoría de la TetA sintetizada está asociada con las vesículas (fracción 2). Esta asociación no tiene lugar cuando no se añaden las vesículas a la reacción de síntesis de proteínas, según indica la retención de la TetA agregada en las fracciones inferiores (fracciones 6-8). Las reacciones que no contenían vesículas adicionales no mostraron gran cantidad de producto proteínico asociado a las membranas o agregado. Esto resalta la importancia de la fosforilación oxidativa en la producción de proteínas que contienen aminoácidos no naturales. Una ruta semejante no es tan activa cuando no hay presentes vesículas adicionales. Según se observa en la figura 8B, la cantidad de TetA que se demuestra que se inserta en las vesículas corresponde a un rendimiento general superior a 100 μg de TetA insertada por ml de reacción acelular. Aparentemente, la TetA truncada en el aminoácido 182 también se inserta, ya que la mayoría del producto de la reacción de Q182STOP estaba a la vez truncado y asociado a las vesículas (véase la figura 8A).

25

30

[0111] Para asegurar que nuestra proteína de membrana se había insertado adecuadamente en las vesículas, la mezcla de reacción dializada se expuso a 0,2 μg/μl de la proteasa inespecífica proteinasa K. Las porciones de la proteína de membrana no embebidas en la membrana, como los dominios citoplásmicos o bucles de gran longitud entre los segmentos transmembrana, son degradados más rápidamente por la proteasa en comparación con los segmentos dentro de la membrana o en el interior de las vesículas. Por lo tanto, mediante la observación de los fragmentos proteínicos generados por la digestión con proteinasa K en función del tiempo se pudo verificar si la proteína tenía la topología esperada, correspondiente a un plegamiento correcto.

40

[0112] La figura 9 muestra el perfil de bandas obtenido después de la incubación con proteinasa K a 25°C. Incluso después de 60 min, una fracción significativa de la TetA de longitud completa está todavía presente en las vesículas. Sin embargo, si las membranas se disuelven con el detergente LDS, la Tet A deja de estar protegida frente a la digestión. Por lo tanto, la TetA está incorporada en las membranas de las vesículas.

45

[0113] Estos datos demuestran la síntesis de grandes rendimientos de proteínas de membrana modificadas mediante un sistema de expresión acelular; y además demuestran que la proteína sintetizada se inserta en las vesículas y está plegada correctamente.

50

Ejemplo 9

Síntesis de un gen optimizado de MS2

55

Materiales y procedimientos

[0114] Construcción de plásmidos. El gen de la proteína de la cubierta de MS2 se optimizó a la vez para las concentraciones relativas de ARNt de *E. coli* (codones preferidos) y para la síntesis a partir de oligonucleótidos

mediante DNAworks. Los oligonucleótidos (60pb de longitud media, Operon Technologies, EE. UU.) basados en las secuencias recomendadas por DNAworks se ensamblaron para dar la secuencia nucleotídica optimizada del gen de la proteína de la cubierta de MS2 por medio de una PCR en dos etapas. El plásmido pET24a-MS2cp se generó por ligación (ADN-ligasa de T4, NEB, EE. UU.) de la secuencia optimizada de la proteína de la cubierta de MS2 en el vector pET-24a(+) (Novagen, EE. UU.) en los sitios de restricción para *NdeI* y *SaI*. El plásmido pET24a-MS2cp se transformó en células DH5 α (células competentes One Shot MAXX Efficiency DH5 α -T1^R, Invitrogen) y el plásmido se purificó con el kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). Mediante PCR en dos etapas y oligonucleótidos diseñados específicamente (Operon Technologies, EE. UU.), se introdujo una mutación de sustitución T15STOP (codón de parada ámbar) en la secuencia de MS2cp. La secuencia mutada se ligó en el vector pET24a(+) (Novagen, EE. UU.) en los sitios de restricción para *NdeI* y *SaI* y se denominó pET24a_MS2cp_T15STOP. El vector se transformó en células DH5 α (células competentes One Shot MAXX Efficiency DH5 α -T1^R, Invitrogen) y el plásmido se purificó con el kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) para usarlo en las reacciones de síntesis acelular de proteínas. La secuencia optimizada de la proteína de la cubierta se proporciona como SEQ ID NO:9.

15

Ejemplo 10

Expresión de la proteína de la cubierta de MS2 con un aminoácido no natural

20 Materiales y procedimientos

[0115] Sistema de expresión acelular PANOX-SP. Las reacciones acelulares PANOX-SP⁶ llevadas a cabo en este ejemplo fueron de 30 μ l de volumen y se incubaron a 30°C durante 8 h en tubos Eppendorf de 1,5 ml. La reacción incluye los siguientes componentes: ATP 1,2 mM, GTP, UTP y CTP, respectivamente 0,85 mM, 34 μ g/ml de ácido folínico, 170,6 μ g/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, plásmido pET24aMS2_T15STOP 24 mM, 100 μ g/ml de ARN-polimerasa de T7, L-[U-¹⁴C]-leucina 5 μ M, 20 aminoácidos naturales, respectivamente 2 mM, *p*-azidofenilalanina 4 mM, aproximadamente 150 μ g/ml de tirosina-sintetasa de *Methanococcus jannaschii* mutada pura, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) 0,33 mM, coenzima A (CoA) 0,27 mM, fosfoenolpiruvato 30 mM, espermidina 1,5 mM, putrescina 1 mM, glutamato de potasio 170 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de magnesio 20 mM, oxalato de sodio 2,7 mM y el 28% v/v del extracto S30 de KC6_ARNt preparado según se describe a continuación. La ARN-polimerasa de T7 se prepara a partir de la cepa BL21(pAR1219) de *E. coli*, según describen Grodberg y Dunn.

[0116] Purificación de la tirosina-sintetasa ortogonal de *Methanococcus jannaschii*. Para este experimento, se produjo y se purificó la tirosina-sintetasa mutante de *Methanococcus jannaschii* que incorpora fácilmente *p*-azidofenilalanina. Las mutaciones necesarias han sido publicadas por Chen y col., cita anterior. Este gen se insertó detrás de un promotor de T7, al extremo C se le unió una etiqueta de hexahistidina y el plásmido resultante se transformó en la cepa celular BL21DE3 pLys. Las células se cultivaron en el medio LB y se indujeron a una DO de 0,6 con IPTG 1mM. Las células se recolectaron a una DO de 3 y se centrifugaron a 7.140 x g durante 30 min. Después, las células se resuspendieron y se lavaron en el tampón S30 (Tris-acetato 10 mM, pH 8,2, acetato de magnesio 14 mM, acetato de potasio 60 mM) y se centrifugaron tres veces sucesivas. A continuación, el sedimento de células se resuspendió y las células se lisaron mediante homogeneización en un solo paso. Las células rotas se centrifugaron después a 20.000 x g durante 30 min. El sobrenadante se recogió y se incubó con ADNasa durante 30 min a temperatura ambiente. Después, el sobrenadante se cargó en una columna de Ni-NTA de 1 a 5 ml equilibrada con imidazol 10 mM, tampón de fosfato 50 mM (pH 8,0) y NaCl 300 mM. A continuación, la columna se lavó con 30 ml de imidazol 25 mM en el mismo tampón y se eluyó con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Los productos purificados se concentraron con unidades de filtración para centrifugación Amicon Ultra-15 (corte de peso molecular, 5.000) y se dializaron con tubos de diálisis con un corte de peso molecular de 7.000 frente a tampón de fosfato salino (PBS).

50

[0117] Producción de extracto S30 con elevadas concentraciones del ARNt ortogonal. En esta estrategia se alcanzaron y se controlaron elevadas concentraciones de ARNt ortogonal (con el uso del gen tRNA_{mj}, SEQ ID NO:10, insertado en el vector pK7) durante la producción del extracto celular. Los extractos se generaron con el plásmido pK7tRNA_{mj} expresado durante el crecimiento de la cepa celular KC6 (A19 Δ tonA Δ tnaA Δ speA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB Δ gshA met⁺). La cepa celular KC6 (también podrían haberse utilizado KKG10, MCJ29, AGR1 y AGR2) con el plásmido pK7tRNA_{mj} (denominada KC6_tRNA) se cultivó en un fermentador de 4 litros en medio definido (18). La fermentación se recolectó a una DO de 3 y el extracto se preparó mediante un procedimiento abreviado descrito por Liu y col. Este procedimiento se modificó de las maneras siguientes: (1) no se realizó ninguna dilución con el tampón S30 después de las centrifugaciones de homogeneización y (2) solo se llevó

55

a cabo una etapa de diálisis.

- [0118] Determinación del rendimiento de proteína.** Los rendimientos totales de proteína sintetizada se determinaron por precipitación con TCA y medición de la radiactividad en un contador de centelleo líquido (LS3801, Beckman Coulter, Inc.). Los rendimientos solubles se determinaron por precipitación con TCA y recuento de centelleo de los sobrenadantes después de la centrifugación de las muestras a 25°C y 15.000 x g durante 15 min.

Resultados

- 10 **[0119]** Se llevaron a cabo reacciones acelulares de 30 µl en el sistema PANOx-SP con el plásmido pET24a_MS2cp_T15STOP y los rendimientos totales y solubles determinados fueron de 77 µg/ml (± 6,6 µg/ml) y 63 µg/ml (± 3,2 µg/ml), respectivamente, según se indica en la figura 10.

Ejemplo 11

- 15 **Demostración del ensamblaje de VLP de MS2 con la incorporación de p-azidofenilalanina**

Materiales y procedimientos

- 20 **[0120] SDS-PAGE y autorradiografía.** Las proteínas solubles se separaron de las fracciones insolubles por centrifugación a 15.000 g durante 15 min. La muestra se cargó en un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen, La Jolla, CA, EE. UU.) sometido a electroforesis en el tampón MES con el estándar Mark 12 (Invitrogen) como marcador de pesos moleculares. Los geles se tiñeron con el colorante azul de Coomassie (BioRad) y se secaron con un secador de geles, modelo 583 (BioRad, Richmond), CA, EE. UU.), antes de exponerlos a películas para imágenes científicas Kodak (Rochester, NY, EE. UU.).

- 25 **[0121] Diálisis.** Para eliminar la L-[U-¹⁴C]-leucina no incorporada, el producto acelular se dializó en tubos de membrana de porosidad molecular Spectra/Pro (Spectrum labs) con un corte de peso molecular de 6-8.000 frente a 300 ml del tampón TSM (Tris-HCl 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, cloruro de magnesio 1 mM, pH 7,0) durante la noche con dos cambios de tampón.

- 30 **[0122] Sedimentación por velocidad en un gradiente escalonado de sacarosa.** El producto de la reacción acelular dializado se sometió a centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Se rellenaron tubos de centrífuga de polialosa de 16 x 102 mm (Beckman, Palo Alto, CA, EE. UU.) sucesivamente con 1 ml de disoluciones de sacarosa de concentración descendente en etapas del 2,5% p/v (40%, 37,5%, 35%, 32,5%, 30%, 27,5%, 25%, 22,5%, 20%, 17,5%, 15%, 12,5%, 10% p/v) en el tampón TSM con EDTA 15 mM. El producto de la reacción acelular dializado se depositó en la parte superior del tubo y la centrifugación se llevó a cabo a 31.000 rpm en un rotor Beckman Coulter SW-32 de tubos basculantes (Fullerton, CA, EE. UU.) en una ultracentrífuga Beckman L8-M a 4°C durante 3,5 h con aceleración "lenta" (perfil 9) y con deceleración "sin freno". Las fracciones de 0,5 ml se recogieron mediante un sistema de fraccionamiento de gradientes de densidad de Teledyne Isco Foxy Jr. (Lincoln, NE) y la concentración de la proteína de la cubierta de MS2 en cada fracción se determinó por precipitación con TCA y medición de la radiactividad con un contador de centelleo líquido (LS3801, Beckman Coulter, Inc.).

- 35 **[0123] Determinación del rendimiento de la proteína de la cubierta de MS2 radiomarcada en las fracciones del gradiente de sacarosa.** Los rendimientos de la proteína de la cubierta de MS2 en cada fracción del gradiente de sacarosa se determinaron por medición de la radiactividad después de aplicar 50 µl de cada fracción en papeles de cromatografía individuales (Whatman, EE. UU.) y dejarlos secar. Los papeles de cromatografía se sumergieron en 5 ml del cóctel de centelleo ReadySafe de Beckman y la radiación se determinó en un contador de centelleo líquido (LS3801, Beckman Coulter, Inc.). El recuento de radiación se convirtió en rendimiento sobre la base del peso molecular de la proteína de la cubierta de MS2 y del número de leucinas en la proteína de la cubierta de MS2 en las que podría haberse incorporado leucina radiomarcada.

- 40 **[0124] Concentración de VLP.** Las fracciones del gradiente de sacarosa que contenían las VLP se concentraron por relleno de dispositivos de filtración por centrifugación Amicon Ultra-4 de un corte de peso molecular de 100.000 con las fracciones del gradiente y el tampón TSM hasta 4 ml. Las unidades se centrifugaron durante 15 min a 5.500 rpm y 4°C en una centrífuga Sorvall RC5B con un rotor Fiberlite F13-14x15cy (Piramoon Tech.) y adaptadores Fiberlight de 15 ml (Piramoon). La muestra concentrada se recogió inmediatamente y se almacenó a 4°C.

Resultados

[0125] Para verificar que toda la proteína producida en la reacción acelular PANOx-SP modificada con el vector pET24a_MS2cp_T15STOP incluía el aminoácido no natural *p*-azidofenilalanina, se llevaron a cabo un control positivo y un control negativo en paralelo. El control negativo se realizó en las mismas condiciones, excepto por la ausencia de la sintetasa ortogonal. La reacción de control positivo se llevó a cabo con el vector pET24a-MS2cp en la reacción acelular PANOx-SP modificada. El rendimiento de ensamblaje de la proteína de la cubierta de MS2 con *p*-azidofenilalanina incorporada, expresada por el vector pET24a_MS2cp_T15STOP en la reacción acelular de base procarionota descrita en la sección de procedimientos, determinado por sedimentación por velocidad en un gradiente de sacarosa seguida del recuento de la radiación, fue de 22 µg/ml (\pm 0,6 µg/ml, $n = 2$), según se indica en la figura 11.

Ejemplo 12

15 Validación del ensamblaje de VLP de MS2 con 180 *p*-azidofenilalaninas accesibles por medio de un aparato de CL-EM con trampa de iones ThermoFinnigan LCQ Deca XP+

Materiales y procedimientos

20 **[0126] Protocolo de espectrometría de masas.** La cápsida de MS2 con el aminoácido no natural incorporado y una muestra de la cápsida de MS2 natural como control se concentraron mediante filtros de membrana Amicon Ultra-4. Estas muestras se obtuvieron a partir de VLP de MS2 ensambladas, recogidas de muestras de un gradiente de densidad de sacarosa similares a las mostradas en la figura 11. Las muestras se cargaron en un gel de Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen, La Jolla, CA, EE. UU.) al 10%. El gel se sometió a electroforesis en el tampón MES (Invitrogen) durante 60 min a 60 mA con el estándar Mark 12 (Invitrogen) como marcador de pesos moleculares y se tiñó con el colorante SimplySafe (Invitrogen). El gel se decoloró por inmersión en agua durante la noche con un mínimo de lavados con agua. Las bandas a 13,7 kDa se cortaron del gel húmedo excluyendo en lo posible el gel blanco circundante.

30 **[0127]** A los fragmentos cortados del gel se les añadieron 10 ml de ditioneol (DTT, Sigma) 45 mM y 100 ml de Tris 100 mM, pH 7,8 y la muestra se incubó a 55°C durante 30 min, después de lo cual se descartó la fase de la disolución. A continuación se añadieron 10 ml de acrilamida 100 mM (ICN) y 100 ml de Tris 100 mM, pH 7,8 a los fragmentos del gel y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez más se descartó la fase de la disolución. Después, las piezas del gel se lavaron con 500 ml de Tris 50 mM, pH 7,8/acetonitrilo al 50% (ICN) durante 30 min y se descartó la fase de la disolución. Seguidamente, los fragmentos del gel se secaron completamente en un dispositivo rotavapor SpeedVac. Finalmente, a los fragmentos del gel se les añadieron 5 pmol de quimotripsina en Tris 25 mM, pH 7,8 y, cuando estos se hincharon, se añadió el suficiente Tris 25 mM, pH 7,8 a la disolución para cubrir apenas los fragmentos. Los fragmentos se incubaron durante la noche a 37°C. La fase de la disolución se recogió y se inyectó sin más tratamiento en un aparato de CL-EM con trampa de iones

40 ThermoFinnigan LCQ Deca XP+ para su análisis.

Resultados

[0128] La figura 13A muestra el perfil de HPLC del fragmento digerido con quimotripsina del monómero de la cápsida natural de MS2 que incluye el aminoácido T15 (881,6 m/z). Después de la digestión, la secuencia del fragmento que contenía T15 era (SEQ ID NO:13) VLVDNNGGTGDVTVAPSNF, PM = 1.761,91, m/z = 882. La figura 13B muestra el monómero natural de MS2 y muestra la región del perfil de HPLC en la que se esperaba que apareciera el mismo fragmento de la figura 13A en caso de contener el aminoácido no natural (912 m/z). La secuencia esperada para el fragmento con *p*-azidofenilalanina en la posición T15 era (SEQ ID NO:13) VLVDNNGGXGDVTVAPSNF y su peso molecular y la relación masa/carga esperados eran PM = 1.821, m/z = 912. Según lo esperado, la muestra de control con MS2 natural no contiene el aminoácido no natural, ya que, después de la digestión con quimotripsina, no se observa ningún pico correspondiente a dónde se espera la elución del fragmento con el aminoácido no natural incorporado.

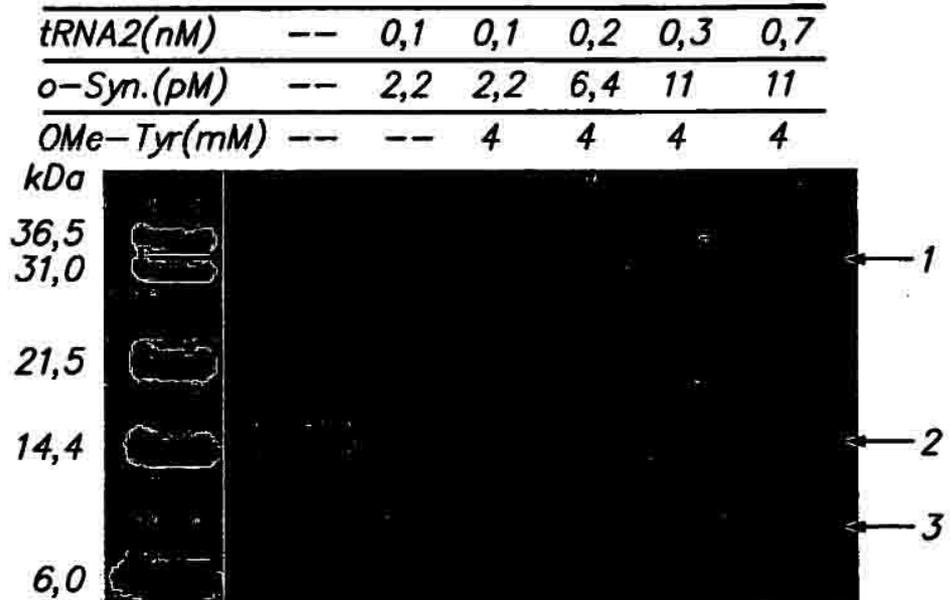
55 **[0129]** La figura 13C muestra un cromatograma de la cápsida de MS2 sustituida en la posición T15 con *p*-azidofenilalanina. Según se ha señalado previamente, esta es la región en la que se esperaba encontrar al fragmento si no se hubiera incorporado el aminoácido no natural. Claramente, este no es el caso. Finalmente, la figura 13D muestra el perfil de HPLC y la relación masa/carga medida para la muestra del monómero de MS2 que contiene la sustitución de T15 por *p*-azidofenilalanina. El pico eluye donde se esperaba y tiene la relación

masa/carga esperada para el fragmento peptídico con el aminoácido no natural incorporado. Estos resultados permiten concluir que se ha incorporado *p*-azidofenilalanina satisfactoriamente en un epítopo externo de la cápsida vírica de MS2.

- 5 **[0130]** Ha de entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos concretos descritos, ya que, por supuesto, estos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en este documento tiene solamente la finalidad de describir realizaciones concretas.
- 10 **[0131]** A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a aquellos descritos en este documento puede usarse en la práctica o en la comprobación de la invención, en este documento se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.
- 15 **[0132]** Todas las publicaciones mencionadas en este documento tienen la finalidad de describir y divulgar, por ejemplo, las líneas celulares, construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones que pudieran usarse en conexión con la invención presentemente descrita. Las publicaciones discutidas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.
- 20 Nada en este documento ha de interpretarse como una admisión de que los inventores no tengan derecho a preceder a tal divulgación en virtud de una invención anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la síntesis de un polipéptido que contiene al menos un aminoácido no natural en un sitio específico en una reacción acelular *in vitro*, en que el procedimiento comprende: la síntesis del polipéptido en una mezcla de reacción acelular de traducción *in vitro* que comprende un ARNt ortogonal que se aparea con un codón sin sentido, un extracto de células bacterianas derivado de una cepa bacteriana con *ompT* mutado, componentes de la maquinaria de síntesis de polipéptidos y/o ARNm; un molde para la transcripción del polipéptido; monómeros para la síntesis del polipéptido; y cofactores, enzimas y otros reactivos necesarios para la traducción; en que la mezcla de reacción comprende una ARNt-sintetasa ortogonal sintetizada exógenamente que aminoacila el codón ortogonal con un aminoácido no natural; en que el polipéptido se sintetiza con al menos un aminoácido no natural en un sitio específico.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que la ARNt-sintetasa ortogonal sintetizada exógenamente se añade a la mezcla de reacción a una concentración de al menos 30 µg/ml.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que el ARNt ortogonal se sintetiza endógenamente por las bacterias que son la fuente del extracto de células bacterianas.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicha mezcla de reacción produce al menos aproximadamente 50 µg/ml de proteína que contiene al menos un aminoácido no natural en un sitio específico.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en que al menos el 50% de dicha proteína que contiene al menos un aminoácido no natural en un sitio específico es biológicamente activa.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en que dicha proteína que contiene al menos un aminoácido no natural en un sitio específico se sintetiza en una reacción acoplada de transcripción y traducción.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el ARNt ortogonal se aparea con un codón de parada.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que en la reacción acelular de traducción *in vitro* la fosforilación oxidativa está activada.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que se añaden vesículas de membrana exógenas a dicha reacción acelular de traducción *in vitro*.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicha proteína que contiene al menos un aminoácido no natural en un sitio específico es una proteína unida a la membrana, una proteína secretada o una proteína que comprende al menos un puente disulfuro.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el polipéptido es una proteína de la cubierta de un virus, como una proteína de la cubierta de un bacteriófago, por ejemplo, del bacteriófago MS2.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el polipéptido es la proteína de la cubierta de un virus y en que se sintetizan dos o más especies de proteína de cubierta.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en que el aminoácido no natural proporciona un grupo reactante que no está normalmente presente en el aminoácido.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en que el aminoácido no natural es una fenilalanina o una tirosina modificadas.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en que el aminoácido no natural está modificado en las posiciones *orto* o *para*, como un aminoácido elegido entre *p*-acetilfenilalanina, *p*-etilfenilalanina, *p*-propargiloxifenilalanina y *p*-azidofenilalanina.
16. Un kit para usar en cualquiera de los procedimientos de acuerdo con las reivindicaciones 1-16.



Banda 1: producto sintetasa ortogonal
Banda 2: producto proteína modificada
Banda 3: producto mGM-CSF truncada

FIG. 1

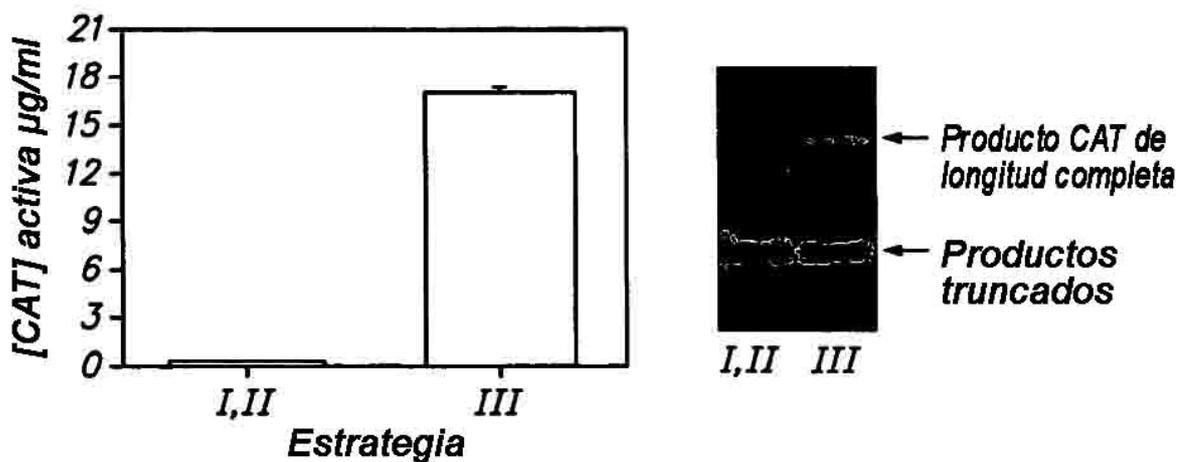


FIG. 2

Adición de 0-->167 µg/ml de sintetasa



FIG. 3A

Tiempo (h) 0,25 0,50 0,75 1,0 3,0 6,0 10,0 22,0

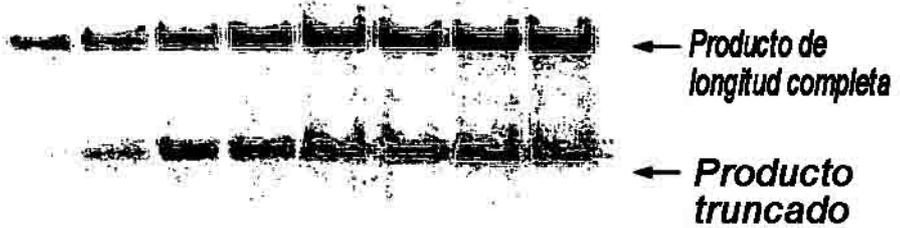


FIG. 3B

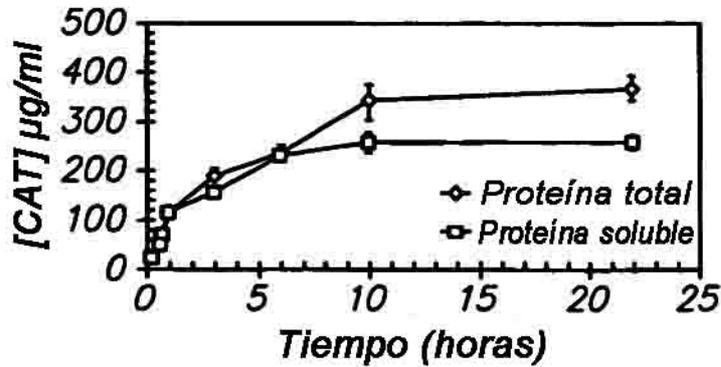


FIG. 3C

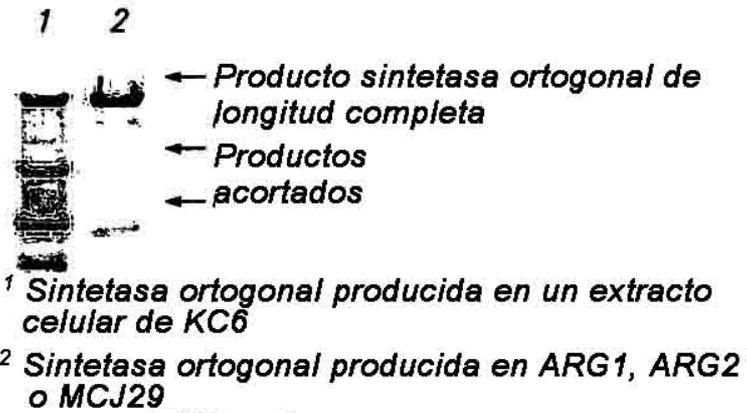


FIG. 4

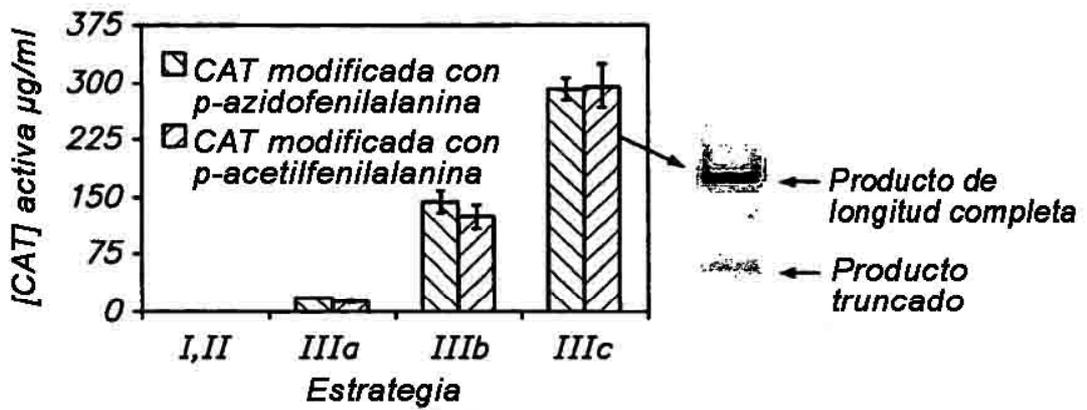


FIG. 5

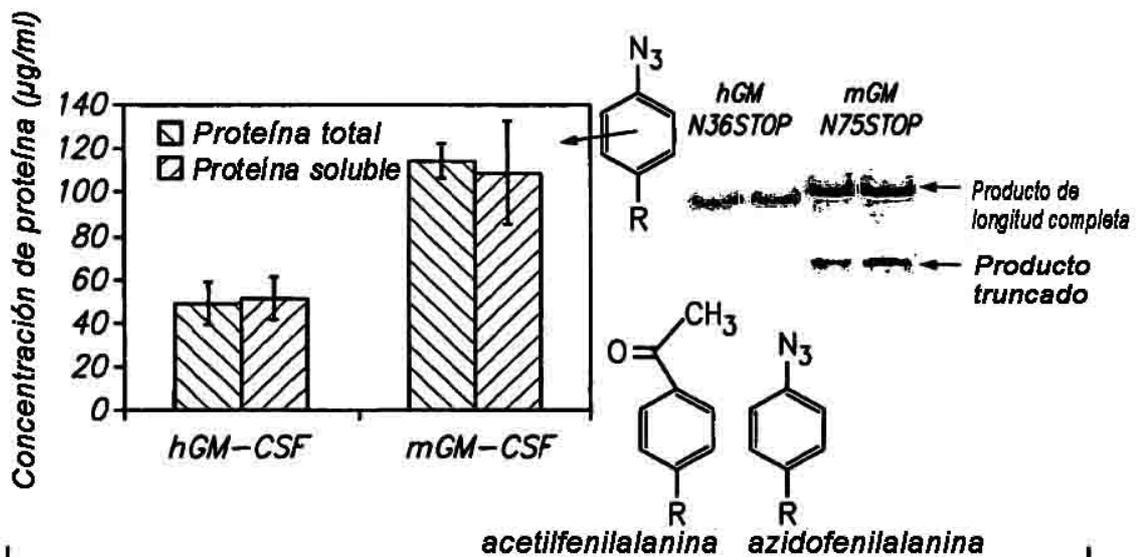
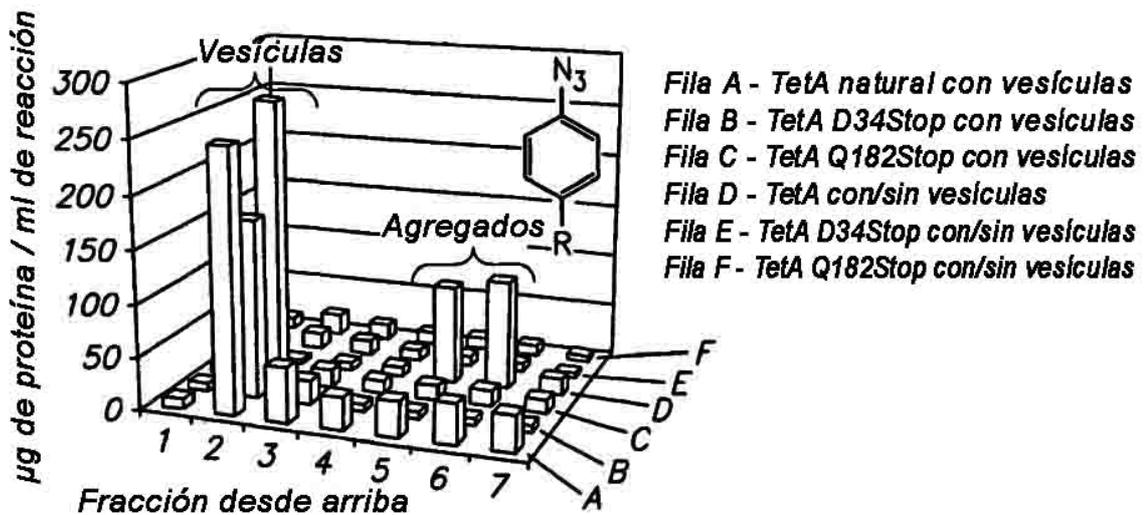
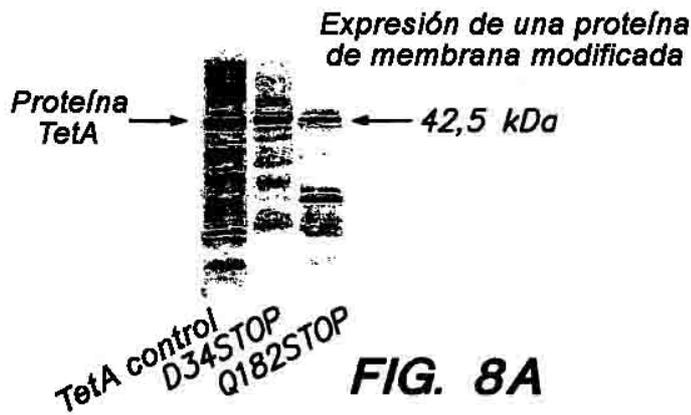
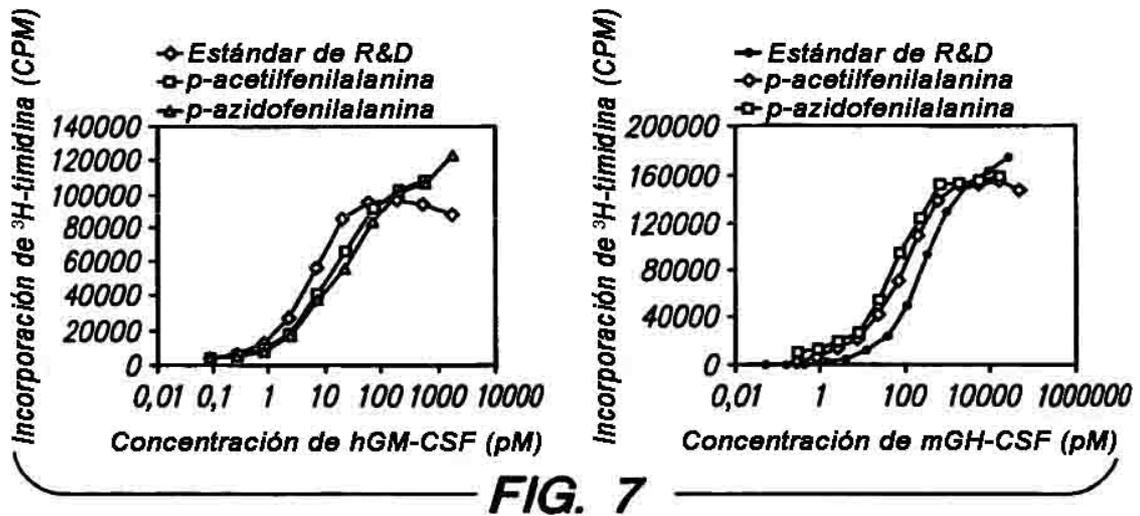


FIG. 6



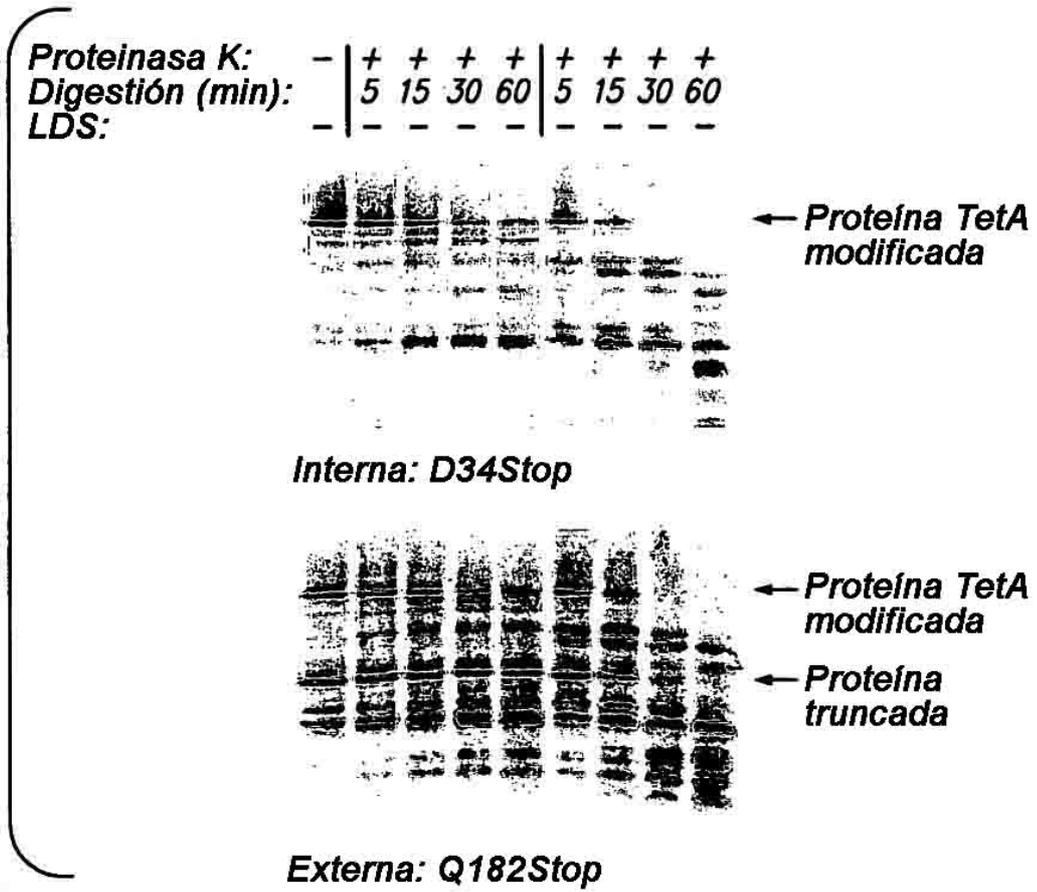


FIG. 9

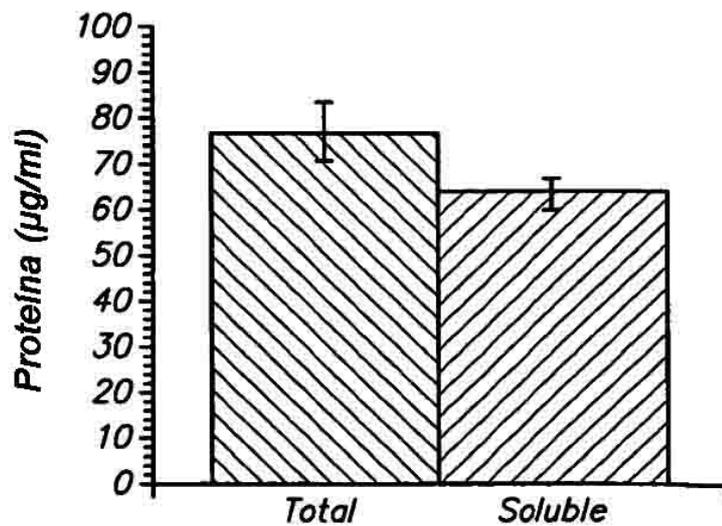


FIG. 10

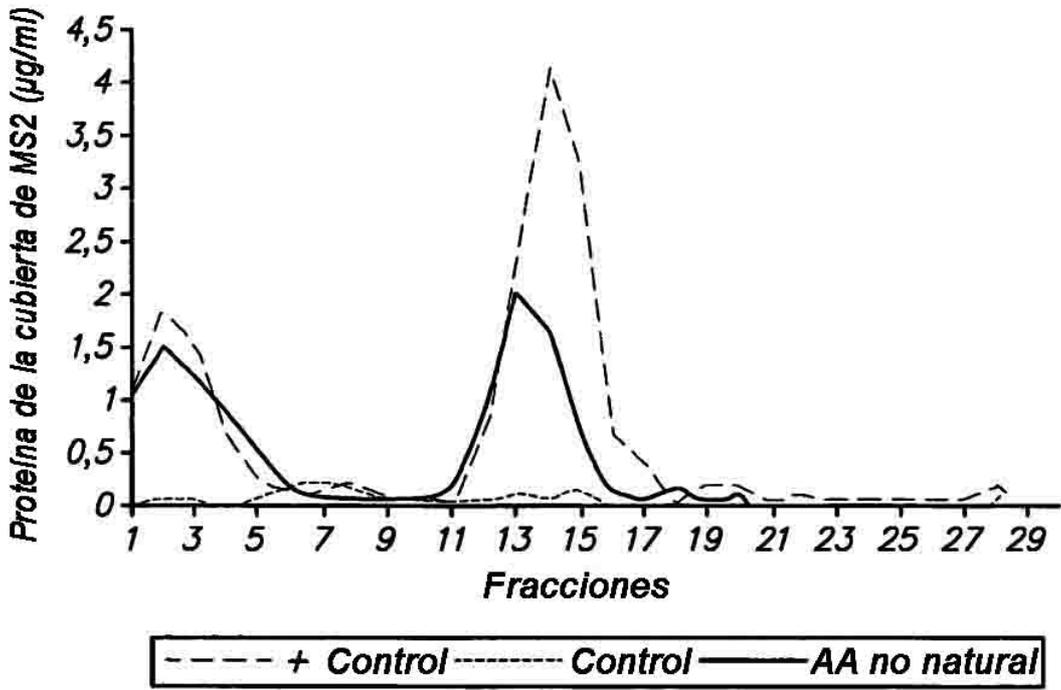


FIG. 11

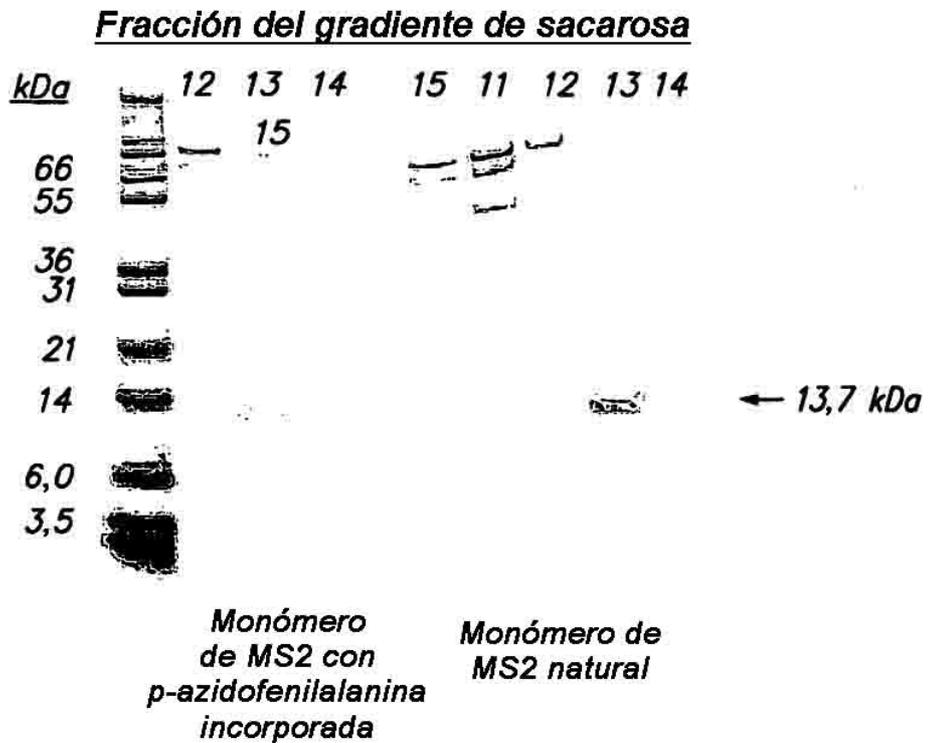


FIG. 12

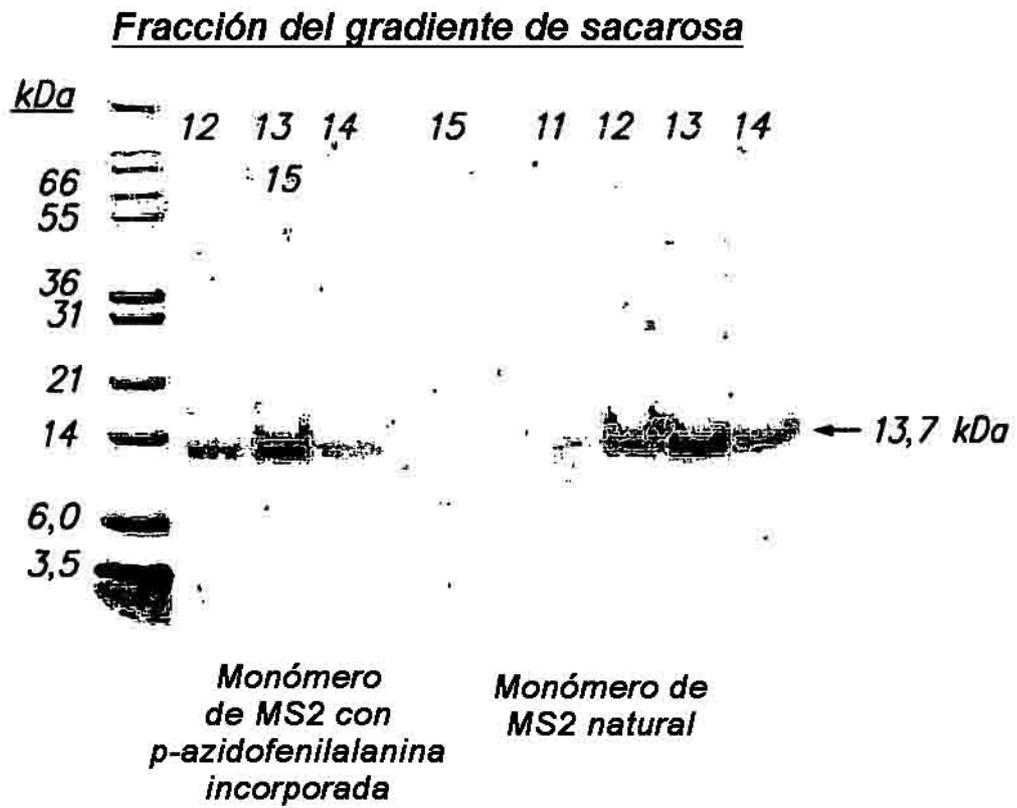


FIG. 13

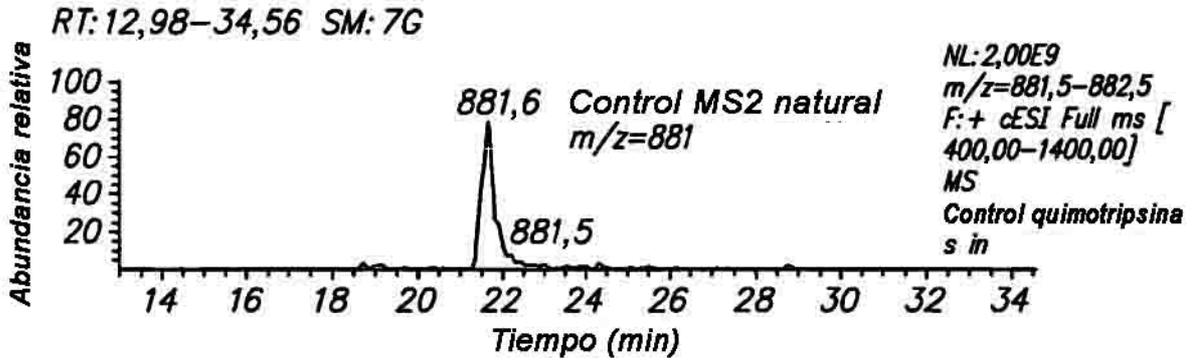


FIG. 14A

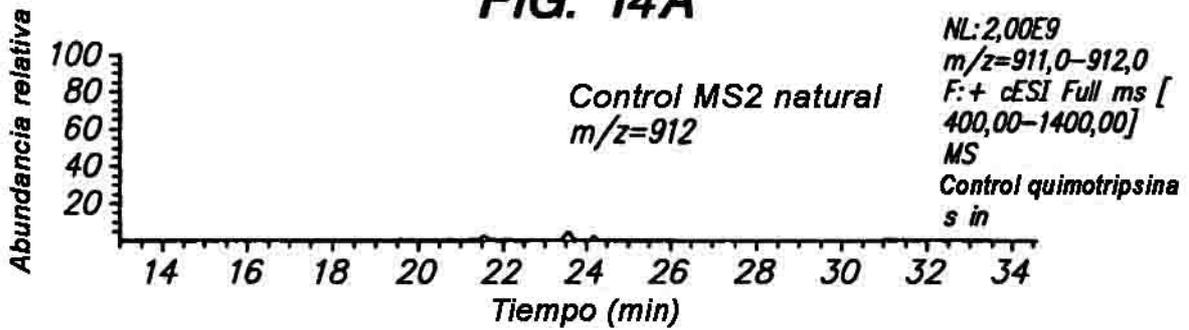


FIG. 14B

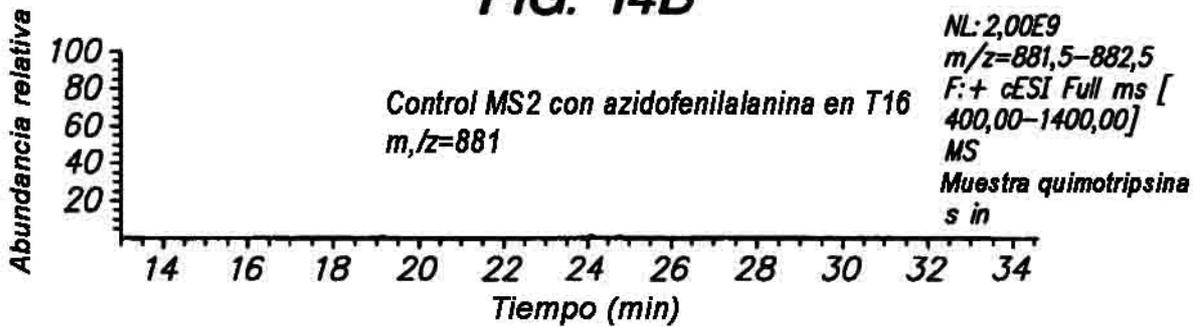


FIG. 14C

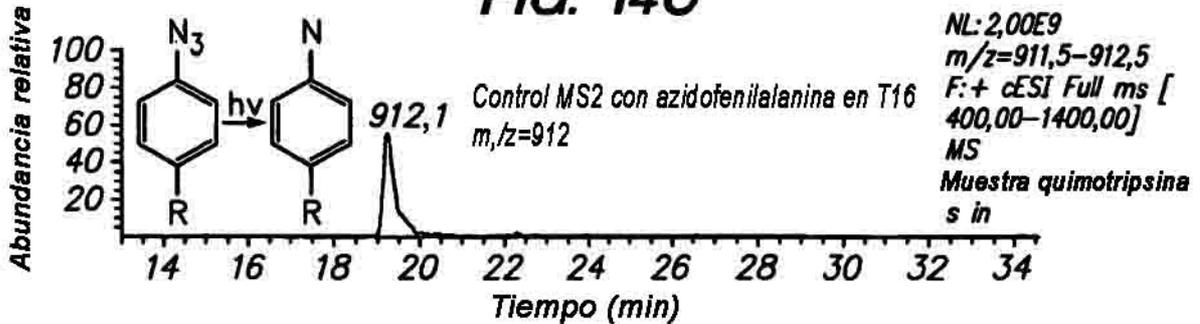


FIG. 14D