

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 608**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2004 E 04811533 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1685240**

54 Título: **Métodos mejorados de síntesis proteica in vitro**

30 Prioridad:

20.11.2003 US 524374 P

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

30.03.2015

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:

**CALHOUN, KARA;
JEWETT, MICHAEL, CHRISTOPHER y
SWARTZ, JAMES, ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 532 608 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

Métodos mejorados de síntesis proteica *in vitro*

5 **Antecedente de la invención**

La síntesis dirigida de macromoléculas biológicas es uno de los grandes logros de la bioquímica. Con la llegada de la tecnología de ADN recombinante (ADNr), se ha hecho posible el empleo de la maquinaria catalítica de la célula para producir una proteína deseada. Esto se puede conseguir en el ambiente celular o *in vitro* utilizando extractos derivados de las células.

La síntesis de proteínas libre de células ofrece varias ventajas sobre los métodos de expresión de proteínas convencionales, *in vivo*. Los sistemas libres de células se pueden dirigir en su mayoría, si no completamente, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Además, la falta de una pared celular y componentes de membrana *in vitro* es ventajoso ya que permite el control del entorno de síntesis. Por ejemplo, se pueden cambiar los niveles de ARNt para reflejar el uso del codón de los genes que se van a expresar. También se pueden alterar el potencial redox, pH, o fuerza iónica con una mayor flexibilidad que *in vivo* ya que no hay que preocuparse del crecimiento o la viabilidad celular. Además, se puede conseguir fácilmente la recuperación de productos proteicos purificados, con el plegamiento apropiado.

La traducción *in vitro* también es reconocida por su capacidad de incorporar aminoácidos no naturales y marcados con isótopos así como su capacidad para producir proteínas que son inestables, insolubles, o citotóxicas *in vivo*. Además, la síntesis de proteínas libre de células evita los procesos laboriosos necesarios para la clonación y la transformación de células para la expresión de productos de nuevos genes *in vivo*, y ha llegado a ser una tecnología de base para este campo.

A pesar de todas las características prometedoras de la síntesis de proteínas libre de células, su uso práctico y su puesta en marcha a gran escala han estado limitados por varios obstáculos. Entre estos, los más importantes son los tiempos de reacción cortos y los bajos índices de producción de proteína, que dan lugar a rendimientos bajos de síntesis de proteína y un coste excesivo de reactivos. Además, se necesitan reactivos caros, y los métodos convencionales son ineficaces en el uso de estos caros reactivos.

Las reacciones particularmente útiles combinan la transcripción y traducción *in vitro*, proporcionando de esta manera un enlace directo entre una secuencia de ADN codificante y el producto proteico. Sin embargo, la necesidad adicional de reactivos para producir ARNm se añade al coste total de la reacción. Se han tratado en publicaciones recientes muchas estrategias diferentes para la reducción del coste de las reacciones de transcripción *in vitro*, incluyendo la reutilización de las matrices de ADN y el empleo de protocolos de realimentación. Por ejemplo, véase Kern y Davis (1997) "Application of Solution Equilibrium Analysis to *in vitro* RNA Transcription" *Biotechnology Progress* 13:747-756; Kern y Davis (1999) "Application of a Fed-Batch System to Produce RNA by *In vitro* Transcription" *Biotechnology Progress* 15:174-184.

Se necesitan mejoras para optimizar los sistemas de transcripción/traducción *in vitro*. La eliminación continua de los subproductos inhibidores así como el suministro continuo de sustratos para la síntesis puede capacitar los sistemas de reacción continuos o semicontinuos para soportar la síntesis durante largos periodos de reacción. Sin embargo, estas estrategias también pueden dar como resultado el uso ineficaz de los sustratos y por tanto unos altos costes. La aclaración de los productos inhibidores, y la prevención de su síntesis es de gran interés para el desarrollo de sistemas sintéticos *in vitro*. También es importante la reducción de los costes de reactivos. Con la presente tecnología, los costes de reactivos más importantes incluyen los de la fuente de energía química, enzimas, matriz DNA y NTP. Los métodos para disminuir estos costes a la vez que se aumentan los rendimientos son de gran interés.

Bibliografía relevante

Patente de EE. UU. 6.337.191 B1, Swartz et al. Kim y Swartz (2000) *Biotechnol Prog.* 16:385-390; Kim y Swartz (2000) *Biotechnol Lett.* 22:1537-1542; Kim y Choi (2000) *J Biotechnol.* 84:27-32; Kim et al. (1996) *Eur J Biochem.* 239: 881-886; Kim y Swartz (2001) *Biotechnol Bioeng* 74:309-316; Davanloo et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2035-2039 (1984); Datsenko et al., *Proc Nat'l Acad Sci EE. UU.* 97:6640-6645 (2000); Jewett et al. (2002) *Prokaryotic systems for in vitro expression*, in *Gene Cloning and Expression Technologies* (Weiner, M.P. y Lu, Q.: eds.), Eaton Publishing, Westborough, MA., pp. 391-411; Spirin et al., *Science* 242:1162-1164 (1988).

Cunningham y Ofengand (1990) *Biotechniques* 9:713-714 sugieren que la adición de pirofosfatasa inorgánica da como resultado rendimientos de reacción mayores al hidrolizar los pirofosfatos que se acumulan. El pirofosfato es inhibidor debido a que forma complejos con los iones libres de magnesio dejándolos menos disponibles para la reacción de transcripción.

Breckenridge y Davis (2000) *Biotechnology Bioengineering* 69:679-687 sugieren que se puede producir ARN por transcripción de las matrices ADN inmovilizadas en soportes sólidos tales como perlas de agarosa, con rendimientos comparables a la transcripción tradicional en fase de solución. La ventaja del ADN inmovilizado es que las matrices se pueden recuperar de la reacción y reutilizar en múltiples rondas, impidiendo desecharlas innecesariamente y reduciendo significativamente el coste en matrices ADN.

La Patente de EE. UU. nº 6.337.191 describe la síntesis de proteína *in vitro* utilizando intermediarios glucolíticos como fuente de energía; y la Patente de EE. UU. nº 6.168.931 describe el aumento de síntesis *in vitro* de macromoléculas biológicas utilizando un nuevo sistema de regeneración de ATP.

Sumario de la invención

Se proporcionan métodos mejorados como se definen en la reivindicación 1 para la síntesis *in vitro* de moléculas biológicas, proporcionando rendimientos mejores, costes más bajos, y mayor utilidad. Las reacciones mejoradas de síntesis de proteínas libres de células utilizan una fuente de energía libre de fosfatos para la producción de ATP, incluyendo por ejemplo, glucosa, glutamato, piruvato, etc. Los nucleósidos trifosfato se sustituyen opcionalmente por nucleósidos monofosfato. Estas mejoras disminuyen drásticamente los costes y aumentan la robustez de las reacciones de síntesis proteica libre de células.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que compara el nivel de síntesis de proteínas *in vitro* con el sistema que compone la presente invención utilizando piruvato como fuente de energía y nucleósidos monofosfato más fosfato a varias concentraciones. Se determinó la expresión de CAT a partir de la incorporación de ^{14}C -leucina. Las barras de error representan el intervalo de dos experimentos por separado.

La Figura 2 es un gráfico de barras que compara el nivel de síntesis de proteína *in vitro* con el sistema que compone la presente invención utilizando glucosa como fuente de energía con nucleósidos trifosfato y varias cantidades de fosfato. Se determinó la expresión de CAT a partir de la incorporación de ^{14}C -leucina. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos por separado.

La Figura 3 es un gráfico de barras que compara el nivel de síntesis de proteína *in vitro* con el sistema que compone la presente invención utilizando glucosa como fuente de energía y varios componentes para las reacciones libres de células satisfactorias. Se determinó la expresión de CAT a partir de ^{14}C -leucina. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos por separado.

Figura 4: Efecto de 10 mM de fosfato adicional en las reacciones de síntesis de proteína libre de células utilizando glucosa como fuente de energía con o NTP o NMP. Las barras de error representan la desviación estándar de nueve experimentos (n=9).

Figura 5: Concentración de ATP en las reacciones libres de células que utilizan glucosa como fuente de energía con NTP o NMP. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos (n=3).

Figura 6. Expresión de CAT utilizando el sistema Cytomim con o sin adición de fosfato. Las reacciones (15 μl) se llevaron a cabo durante 6 horas y se determinó la expresión de CAT por la incorporación de ^{14}C -leucina. Las barras de error representan la desviación estándar de once experimentos individuales. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando el sistema Cytomim sin piruvato sódico y con NTP. Se indican las concentraciones de fosfato en el eje X.

Figura 7. Expresión de CAT en el tiempo utilizando el sistema Cytomim (peso/NTP) sin piruvato y con 10 mM de fosfato adicional. Las reacciones se llevaron a cabo durante 6 horas a 37 °C y se determinó la expresión de CAT por la incorporación de ^{14}C -leucina y un ensayo de actividad enzimática. Se prepararon las mezclas de reacción de quince microlitros en un tubo diferente para cada punto de tiempo. En cada punto de tiempo, se sacrificó un tubo con el fin de determinar la cantidad de proteína expresada. Las barras de error representan la desviación estándar de siete experimentos separados. (■) Rendimiento total de CAT controlada por la incorporación de ^{14}C -leucina en el sistema Cytomim. (●) Rendimiento soluble de CAT controlado por la incorporación de ^{14}C -leucina en el sistema Cytomim. (▲) Rendimiento activo de CAT determinado por un ensayo enzimático.

Figura 8. Expresión de CAT utilizando el sistema Cytomim sin piruvato y con 10 mM de fosfato en una columna de burbujas 1 ml. Las reacciones (1 ml) se llevaron a cabo durante 5 horas a 37 °C. La expresión de CAT se determinó por la incorporación de ^{14}C -leucina. Las barras de error representan el valor más alto y más bajo de dos experimentos individuales. A aproximadamente 3,5 horas, el reactor empezó a formar espuma, la adición posterior de 1×10^{-4} (v/v) de antiespuma Sigma 0-30 controló este problema.

Figura 10. Los estudios de optimización de fosfatos en el sistema Cytomim que se basan en la expresión relativa total de CAT. Todos los experimentos se hicieron utilizando las condiciones del sistema Cytomim sin piruvato sódico y con NMP. Se incubaron reacciones de quince mililitros a 37 °C durante 6 horas. Se utilizó fosfato potásico (dibásico, Mallinckrodt: Phillipsburg, NJ), con un pH ajustado a 7,25 con ácido acético glacial.

Descripción detallada de las realizaciones

Se proporcionan métodos mejorados como se definen en la reivindicación 1 para la síntesis *in vitro* de macromoléculas biológicas, proporcionando mejores rendimientos, costes reducidos, y más utilidad. El mejor rendimiento y el coste reducido se obtienen por una combinación de las condiciones de reacción, que incluyen, sin

limitación, el uso de una fuente de energía libre de fosfatos, la ausencia de nucleósidos trifosfato exógenos, la presencia de nucleósidos monofosfato, y fosfato orgánico exógeno.

5 Se necesita ATP para la síntesis de proteínas en las reacciones libres de células. Tradicionalmente, se añade a la reacción un compuesto con un enlace fosfato de alta energía, tal como el fosfoenolpiruvato (PEP), para este propósito. Sin embargo, como también están presentes enzimas glucolíticas en el extracto celular, se puede utilizar la glucosa y otros intermediarios metabólicos, tales como glutamato, piruvato, etc. para realizar las reacciones libres de células con un coste mucho menor, y con un potencial de generación de ATP mayor utilizando métodos que también activan la fosforilación oxidativa. Las condiciones de reacción que generan este entorno más natural se producen como resultado de proporcionar una combinación de factores, que se describen posteriormente. Imitando el entorno celular, se proporciona un aumento de la capacidad sintética.

10 En realizaciones preferidas de la invención, se utiliza una mezcla de reacción como se describe en el presente documento para la síntesis *in vitro* de macromoléculas biológicas utilizando glucosa, glutamato, piruvato, etc. como fuente de energía y sustituyendo los nucleósidos trifosfato exógenos convencionales con nucleósidos monofosfato.

15 Los rendimientos mejores se proporcionan por la adición de fosfato exógeno, por ejemplo fosfato orgánico, etc. El fosfato se proporciona a una concentración de al menos 1 mM, preferentemente al menos aproximadamente 5 mM, y no más de 20 mM, habitualmente no más de aproximadamente 15 mM, y preferentemente aproximadamente 10 mM. Las fuentes útiles de fosfato (PO₄) incluyen varias sales y ácidos que son compatibles con las reacciones biológicas, por ejemplo fosfato potásico, fosfato magnésico, fosfato amónico, etc. En una realización alternativa, el fosfato se proporciona añadiendo una cantidad apropiada de un compuesto que contiene fosfato tal que libere pequeñas cantidades de fosfato, por ejemplo, por liberación enzimática, durante la reacción.

20 Las reacciones están preferentemente sustancialmente libres de polietilenglicol. Al realizar la síntesis en ausencia sustancial de polietilenglicol se permite la activación de la fosforilación oxidativa y proporciona una mejora del plegamiento; y además puede combinarse, por ejemplo, con los métodos descritos en la Patente de EE. UU. nº 6.548.276.

25 Los métodos de la presente invención permiten la producción de proteínas con la adición de una fuente de energía para suplementar la síntesis, donde la fuente de energía está libre de fosfatos, por ejemplo glucosa, piruvato, glutamato, etc. Las fuentes incluyen aminoácidos, por ejemplo glutamato, compuestos del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), citrato, cis-aconitato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil CoA, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato, glioxilato, glicerol, y otros compuestos que pueden dirigirse al metabolismo central, tales como el acetato, etc. La fuente de energía se suministra en concentraciones de al menos 10 mM, preferentemente al menos aproximadamente 20 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 30 mM. Tales compuestos no se añaden habitualmente en concentraciones mayores de 250 mM, más habitualmente no mayores de aproximadamente 150 mM. Por ejemplo una fuente de energía puede ser glutamato potásico, glutamato amónico, y similares. En algunas realizaciones se utiliza un cóctel de fuentes, por ejemplo, una mezcla de glutamato potásico y glutamato amónico; o una combinación de fuente de glucosa y glutamato, etc. Se pueden añadir cantidades adicionales de la fuente de energía a la mezcla de reacción durante el curso de la expresión de proteínas, con el fin de extender los tiempos de reacción. De manera alternativa, se pueden emplear concentraciones iniciales más pequeñas seguidas de alimentación continua intermitente.

30 Síntesis *in vitro*, como se utiliza en el presente documento, se refiere a síntesis libre de células de macromoléculas biológicas en una mezcla de reacción que comprende extractos biológicos y/o reactivos definidos. La mezcla de reacción comprenderá una matriz para la producción de la macromolécula, por ejemplo, ADN, ARNm, etc.; monómeros de la macromolécula que se va a sintetizar, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc., y tales co-factores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores de transcripción, etc. Tales sistemas de reacción de síntesis se conocen bien en la técnica, y se han descrito en la bibliografía. La reacción de síntesis libre de células se puede llevar a cabo por lotes, flujo continuo, o flujo semicontinuo, como se conoce en la técnica. La síntesis *in vitro* de macromoléculas biológicas puede incluir la traducción de ARNm para producir polipéptidos o puede incluir la transcripción de ARNm a partir de una matriz ADN.

35 Las reacciones utilizan preferentemente extractos celulares derivados de células bacterianas cultivadas en un medio que contiene glucosa y fosfato, en el que la glucosa está presente a una concentración de al menos aproximadamente el 0,25 % (peso/volumen), más habitualmente al menos aproximadamente el 1 %; y habitualmente no más de aproximadamente el 4 %, más habitualmente no más de aproximadamente el 2 %. Un ejemplo de tales medios es el medio 2YTPG, sin embargo un experto en la técnica apreciarán que se pueden adaptar muchos medios de cultivo, particularmente medios definidos, para este fin, como los muchos medios publicados adecuados que hay para el cultivo de bacterias tales como *E. coli*, utilizando fuentes definidas e indefinidas de nutrientes (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 para los ejemplos de medios que contienen glucosa).

65

La cepa particular de bacterias, por ejemplo *E. coli*, que se utiliza para el desarrollo de esta nueva tecnología se puede optimizar. En particular, se pueden hacer modificaciones genéticas en la cepa que pueden aumentar la síntesis de proteínas. Por ejemplo, a la cepa que se utiliza en los experimentos descritos anteriormente se le habían eliminado los genes *speA*, *tnaA*, *sdaA*, *sdaB*, *tonA*, y *endA* del cromosoma. Las primeras cuatro mutaciones ayudan a estabilizar las concentraciones de arginina, triptófano y serina en la reacción. Las últimas dos mutaciones protegen frente a la infección por bacteriófagos y estabilizan el ADN en el sistema. De manera alternativa, se pueden añadir a la mezcla de reacción, inhibidores metabólicos de la actividad enzimática no deseada.

Aunque las mezclas de reacción convencionales (por ejemplo, véase Kim y Swartz, 2001) contienen aproximadamente un 2 % de polietilenglicol 8000, se descubrió que éste disminuía el rendimiento. En los presentes métodos, se utilizan espermidina y putrescina en lugar de PEG. La espermina o espermidina está presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM, habitualmente al menos aproximadamente 1 mM, preferentemente a aproximadamente 1,5 mM, y no más de aproximadamente 2,5 mM. La putrescina está presente a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM, preferentemente al menos aproximadamente 1 mM, preferentemente aproximadamente 1,5 mM, y no más de aproximadamente 2,5 mM. Estas concentraciones son altamente dependientes de la concentración total del extracto utilizado en la reacción libre de células. Un experto en la técnica apreciará que alterando las concentraciones del extracto, también se pueden alterar las concentraciones de espermidina y putrescina a intervalos fuera de los descritos en el presente documento para las condiciones de reacción típicas.

La concentración de magnesio en la mezcla de reacción afecta a la síntesis total. A menudo, el magnesio está presente en los extractos celulares, el cual se puede ajustar después con magnesio adicional para optimizar la concentración. Las fuentes de sales de magnesio útiles en tales métodos se conocen en la técnica. En una realización de la invención, la fuente de magnesio puede ser glutamato magnésico. Una concentración preferida de magnesio es de al menos 5 mM, habitualmente al menos aproximadamente 10 mM, y preferentemente al menos aproximadamente 12 mM; y una concentración de no más de 20 mM, habitualmente no más de aproximadamente 15 mM. La ligera variación de la concentración de glutamato producida por el uso de glutamato magnésico no afecta a los rendimientos.

El sistema se puede ejecutar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Se puede suministrar oxígeno, particularmente para las reacciones mayores de 15 μ l, con el fin de aumentar el rendimiento de síntesis. La cabecera de la cámara de reacción se puede llenar de oxígeno; el oxígeno se puede infundir en la mezcla de reacción; etc. El oxígeno se puede suministrar continuamente o se puede llenar la cabecera de la cámara de reacción durante el curso de la expresión proteica para tiempos de reacción más largos. También se pueden suministrar otros aceptores de electrones tales como nitratos, sulfatos, o fumaratos en conjunto con los extractos celulares preparados de forma que las enzimas necesarias estén activas en el extracto celular.

No es necesario añadir cofactores exógenos. Se pueden utilizar compuestos tales como dinucleótido nicotinamida adenina (NADH), NAD⁺, o Coenzima A para suplementar la síntesis de proteínas, pero no son necesarios.

La matriz para la síntesis de proteínas libre de células es preferentemente ADN. El acoplamiento de transcripción y traducción, que se utiliza en general en los sistemas de *E. coli*, genera ARNm continuamente a partir de la matriz ADN con un promotor reconocible. Se utiliza o una ARN polimerasa endógena o se añade una ARN polimerasa exógena de fago, normalmente T7 o SP6, directamente a la mezcla de reacción. De manera alternativa, se puede amplificar el ARNm continuamente insertando en una matriz el mensaje para replicasa QB, una ARN polimerasa dependiente de ARN. Se pueden retirar las nucleasas de los extractos para ayudar a estabilizar los niveles de ARNm. La matriz puede codificar cualquier gen de interés particular.

También se pueden añadir otras sales, particularmente las que son biológicamente relevantes. El potasio está presente generalmente a una concentración de al menos aproximadamente 50 mM, y no más de aproximadamente 250 mM. El amonio puede estar presente habitualmente a una concentración de no más de 200 mM, más habitualmente a una concentración de no más de aproximadamente 100 mM, y preferentemente a una concentración de no más de aproximadamente 20 mM. Habitualmente, la reacción se mantiene en el intervalo de pH de aproximadamente 5-10 y una temperatura de aproximadamente 20 °C- 50 °C; más habitualmente, en el intervalo de pH de aproximadamente 6-9 y una temperatura de 25 °C- 40 °C. Estos intervalos se pueden extender en condiciones específicas de interés.

También se pueden añadir al sistema vesículas, purificadas del organismo huésped (véase Muller y Blobel (1984) "In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*", PNAS 81:7421-7425) o sintéticas. Estas se pueden utilizar para aumentar la síntesis proteica y el plegamiento. La tecnología descrita en el presente documento se ha mostrado para activar el proceso de fosforilación oxidativa que utiliza componentes de la membrana citoplasmática. Las vesículas de membrana invertida contienen componentes de la cadena respiratoria y debe estar presente la F₁F₀ATPasa para la activación de la fosforilación oxidativa. Los presentes métodos también se pueden utilizar para reacciones libres de células que activan otros grupos de proteínas de membrana; por ejemplo, para insertar o translocar proteínas o para translocar otros compuestos.

En el sistema de glucosa, el tampón es importante para la estabilización del pH. Por ejemplo, el tampón bis-Tris en una reacción de glucosa puede estar presente desde aproximadamente 10 a 150 mM, habitualmente aproximadamente 50 mM. También se pueden utilizar otros tampones siempre que su pKa sea apropiada para la reacción (probablemente entre 6,8 y 7,2). El pH también se puede estabilizar por medio de la adición directa de bases durante la reacción.

Métodos para aumentar la síntesis *in vitro*

Los sistemas sintéticos de interés incluyen sistemas para la replicación de biopolímeros, que pueden incluir la amplificación de ADN, transcripción de ARN a partir de matrices de ADN o ARN en polipéptidos, y la síntesis de carbohidratos complejos a partir de azúcares simples. El aumento de síntesis puede incluir aumentos en la cantidad total o relativa de polipéptidos sintetizados en el sistema; el aumento en la cantidad total o relativa de polipéptidos sintetizados por unidad de tiempo. Los aumentos en la cantidad total o relativa de polipéptidos activos sintetizados en el sistema; aumentos en la cantidad total o relativa de polipéptidos solubles sintetizados en el sistema y similares.

Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala, a pequeña escala, o se puede multiplexar para realizar una pluralidad de síntesis simultánea. Las reacciones continuas utilizarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos, y puede aislar el producto final como parte del proceso. También tienen interés los sistemas discontinuos, en los que se pueden introducir reactivos adicionales para prolongar el periodo de tiempo de síntesis activa. Un reactor puede funcionar de cualquier manera tal como discontinua, discontinua extendida, semi-discontinua, semi-continua, de alimentación discontinua y continua, y cada una se seleccionará de acuerdo con su propósito de aplicación.

Las reacciones pueden tener cualquier volumen, sea a pequeña escala, habitualmente al menos aproximadamente 1 µl y no más de aproximadamente 15 µl, o en una reacción escalada, donde el volumen de reacción es de al menos aproximadamente 15 µl, habitualmente al menos aproximadamente 50 µl, más habitualmente al menos aproximadamente 100 µl, y puede ser de 500 µl, 1000 µl o mayor. En muchos casos, las reacciones individuales no serán mayores de aproximadamente 10 ml, aunque se pueden hacer múltiples reacciones en paralelo. Sin embargo, en principio, las reacciones se pueden llevar a cabo a cualquier escala siempre que se suministre suficiente oxígeno (u otro aceptor de electrones).

De particular interés es la traducción del ARNm para producir proteínas, cuya traducción se puede combinar con síntesis *in vitro* de ARNm a partir de una matriz ADN. Tal sistema libre de células contendrá todos los factores requeridos para la traducción de ARNm, por ejemplo, ribosomas, aminoácidos, ARNt, aminoacilo sintetasas, factores de elongación, factores de iniciación, y factores de reciclado ribosómico. Los sistemas libres de células conocidos en la técnica incluyen los extractos de *E. coli*, etc., que se pueden tratar con una nucleasa adecuada para eliminar los ARNm endógenos activos.

Además de los componentes anteriores tales como el extracto libre de células, matriz genética, y aminoácidos, se pueden añadir materiales necesarios específicamente para la reacción. Estos materiales incluyen sal, ácido folínico, AMP cíclico, inhibidores de enzimas degradantes de ácidos nucleicos y proteínas, inhibidores de reguladores de la síntesis proteica, ajustadores del potencial(es) de oxidación/reducción, tensioactivos no desnaturizantes, componentes tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc.

Las sales incluyen preferentemente sales de potasio, magnesio y amonio (por ejemplo, de ácido acético o ácido sulfúrico). Una o más de tales sales pueden tener aminoácidos como anión contrario, por ejemplo, ácido glutámico. Hay una interdependencia entre especies iónicas para la concentración óptima. Estas especies iónicas están optimizadas normalmente con respecto a la producción de proteínas. Cuando cambia la concentración de un componente particular del medio de reacción, la del otro componente se puede cambiar en consecuencia. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes tales como nucleótidos y compuestos de fuente de energía se pueden controlar simultáneamente según el cambio en las de otros componentes. También, los niveles de concentración de componentes en el reactor se pueden variar con el tiempo. El ajustador del potencial de oxidación/reducción puede ser el ditioneitol, ácido ascórbico, glutatión y/o sus formas oxidadas. También, se incluye opcionalmente un tensioactivo no desnaturizante tal como el Triton X-100, a una concentración de no más de aproximadamente 500 mM, más habitualmente no más de aproximadamente 250 mM.

Cuando se utiliza un medio de aislamiento proteico en un modo de operación continua, el producto resultante del reactor fluye a través de una membrana y entra en el medio de aislamiento de proteínas. En un modo de operación semi-continuo, el lado exterior o la superficie externa de la membrana se pone en contacto con soluciones predeterminadas que se cambian cíclicamente en un orden predeterminado. Estas soluciones contienen sustratos tales como aminoácidos y nucleótidos. En este momento, el reactor se opera en diálisis, diafiltración discontinua o modo de alimentación discontinua. Se puede suministrar una solución de alimentación al reactor por medio de la misma membrana o una unidad de inyección separada. La proteína que se sintetiza se acumula en el reactor, y luego se aísla y purifica de acuerdo con el método habitual para purificación de proteínas tras la terminación del sistema de operación.

5 Cuando hay un flujo de reactivos, la dirección del flujo líquido puede ser perpendicular y/o tangencial a la membrana. El flujo tangencial es eficaz para reciclar el ATP y para evitar el atasco de la membrana y puede superimponerse al flujo perpendicular. El flujo perpendicular a la membrana puede producirse o efectuarse por medio de una bomba de presión positiva o una bomba de succión en vacío. La solución que está en contacto con la superficie exterior de la membrana se puede cambiar cíclicamente, y puede estar en un estado de flujo tangencial con respecto a la membrana. El reactor se puede agitar interna o externamente por un medio de agitación adecuado.

10 Durante la síntesis de proteínas en el reactor, los medios de aislamiento de proteínas para aislar selectivamente la proteína deseada puede incluir una unidad que contiene partículas revestidas con moléculas de anticuerpo u otras moléculas inmovilizadas con un componentes para adsorber la proteína sintetizada, deseada y una membrana con poros de tamaños adecuados. Preferentemente, los medios de aislamiento de la proteína comprenden dos columnas para su uso alterno.

15 La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción se puede medir de varias maneras. Un método reside en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular que se va a traducir. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad de la proteína es el sistema de ensayo de luciferasa, o un sistema de ensayo de cloranfenicol acetil transferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida en la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que es inactiva debido a un plegamiento proteico inadecuado o la falta de otras modificaciones post-traduccionales necesarias para la actividad proteica.

20 Otro método para medir la cantidad de proteína producida en reacciones acopladas de transcripción y traducción *in vitro* es realizar las reacciones utilizando una cantidad conocida de aminoácidos radiomarcados tales como ³⁵S-metionina, ³H-leucina o ¹⁴C-leucina y posteriormente midiendo la cantidad de aminoácido radiomarcado en la nueva proteína traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro* incluyendo los productos proteicos truncados. La proteína radiomarcada puede luego separarse en un gel proteico, y confirmarse por autorradiografía que confirma que el producto es del tamaño adecuado y que no se han producido productos proteicos secundarios.

30 Se tiene que comprender que la presente invención no está limitada por la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones, y reactivos que se han descrito, como tal puede, por supuesto, variar. También se tiene que comprender que la terminología utilizada en el presente documento solamente tiene el propósito de describir realizaciones particulares.

35 A menos de que se defina otra cosa, todos los términos científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

40 Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento tienen el propósito de describir y desvelar, por ejemplo, las líneas celulares, construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, las cuales se pueden utilizar en conexión con la invención descrita en este momento. Las publicaciones mencionadas anteriormente y por todo el texto se proporcionan solamente por su divulgación anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento es para que se entienda como una admisión de que los inventores no tengan derecho a preceder tal divulgación debido a una invención anterior.

45 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituados en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo hacer y utilizar el sujeto de la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, concentraciones, etc.) pero se deberían permitir algunos errores experimentales y desviaciones. A menos de que se indique otra cosa, las partes son partes por peso, el peso molecular es la media del peso molecular, las temperaturas son en grados centígrados; y la presión es la atmosférica o cercana a esta.

55 **Parte experimental**

Ejemplo 1

Glucosa como fuente de energía

Métodos y materiales

65 El entorno Cytomim de referencia para la síntesis, contiene los siguientes componentes: 1,2 mM de ATP, 0,85 mM de cada uno de GTP, UTP, y CTP, 1 mM de DTT, 130 mM de glutamato potásico, 10 mM de glutamato amónico, 8 mM de glutamato magnésico, 34 µg/ml de ácido fólico, 170,6 µg/ml de mezcla de ARN de *E. coli*, 13,3 µg/ml de plásmido, 100 µg/ml de ARN polimerasa T7, 2 mM de cada uno de 20 aminoácidos sin marcar, 11 µM de [¹⁴C]

leucina, 1,5 mM de espermidina, y 1 mM de putrescina, 0,33 mM de dinucleótido nicotinamida adenina, 0,26 mM de Coenzima A, 2,7 mM de oxalato sódico y 0,24 volúmenes de extracto S30. La síntesis proteica libre de células procariontas se lleva a cabo utilizando un extracto bruto S30 de *Escherichia coli* K12 (cepa KC1 descrita en Michel-Reydellet et al (2004) Met Eng (6)197-203, genotipo A19 Δ tonA Δ tnaA Δ speA Δ endA Δ sdaA Δ sdaB met+), con ligeras modificaciones del protocolo de Pratt, J.M. 1984. (Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. En Transcription and translation: a practical approach. Hanes, B.D., y S.J. Higgins. (Eds.). pp. 179-209. IRL Press, Nueva York.) Las células para el extracto se cultivan con medios definidos (Zawada et al. (2003). High-density, defined media culture for the production of *Escherichia coli* cell extracts. En: Saha B, editor. Fermentation Biotechnology. Washington, DC: ACS Press. p 142-156). Se preparó la ARN polimerasa T7 a partir de *E. coli* cepa BL21 (pAR 1219) de acuerdo con los procedimientos de Davanloo et al. 1984 (Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Nat'l Acad. Sci. USA 81:2035-2039). El sistema se puede potenciar con la adición de 33 mM de piruvato sódico, aunque esto no es necesario. Había aproximadamente 3,3 mM de magnesio, 14,4 mM de potasio, 2,4 mM de TRIS, y 23,5 mM de acetato adicionales en cada reacción que se originaron del extracto celular.

El entorno Cytomim modificado para la síntesis, de acuerdo con los métodos de la presente invención, es el siguiente: se añaden 10 mM de fosfato potásico y 50 mM de Bis-Tris (pH 7,0), se utilizaron 5 μ M de [¹⁴C] leucina en vez de 11 μ M. Además se añadieron 30 mM de glucosa, se sustituyeron los 1,2 mM de AMP por 1,2 mM de ATP, y se sustituyeron los 0,85 mM de cada uno de GMP, UMP, y CMP por 0,85 mM de cada uno de GTP, UTP, y CTP. Adicionalmente, se omitió el ácido oxálico.

Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 3-6 horas. La cantidad de proteína sintetizada se estima por la medición de radioactividades de TCA insoluble utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 3801). (Kim et al. 1996). Se determinaron los rendimientos de proteína como se había descrito anteriormente (Kim y Swartz 2000).

Resultados

La mezcla de reacción de referencia para una reacción de transcripción-traducción acopladas está descrita por Kim y Swartz (2001). La fuente de energía en la reacción de referencia es fosfoenolpiruvato (PEP). La sustitución previa directa de PEP con glucosa dio como resultado que virtualmente no se sintetizara proteína. Sin embargo, cuando se reemplazó el PEP por glucosa-6-fosfato (G6P) se observaban rendimientos de proteína significativos de 228 \pm 13 μ g/ml (Kim y Swartz 2001). La glucosa-6-fosfato está solo a un paso de la glucosa en la ruta de la reacción de glucolisis, sugiriendo que la etapa inicial de la fosforilación puede ser limitante. Se llevaron a cabo varios experimentos para aliviar esta limitación que incluían la adición de hexoquinasa o glucoquinasa a la reacción o la alimentación lenta de glucosa. Ninguna estrategia fue satisfactoria.

La reacción con G6P continuó optimizándose por modificaciones en la mezcla de reacción de referencia hasta que los rendimientos utilizando esta fuente de energía promediaban por encima de los 700 μ g/ml. Para obtener estos rendimientos de proteína, se utilizó un nuevo tampón de pH, y se eliminó el ácido oxálico. Además, se demostró que los NTP se podían reemplazar por NMP en la reacción G6P dando rendimientos similares. Esta sustitución disminuyó drásticamente el coste de la reacción. A pesar de estos avances, las condiciones optimizadas no habían permitido una síntesis de proteína significativa cuando la G6P se reemplazaba con glucosa.

Se utilizó satisfactoriamente glucosa como fuente de energía con NMP cuando se reemplazó el polietilenglicol con los cationes naturales putrescina y espermidina y cuando se añadió fosfato adicional a la reacción optimizada, y cuando se omitió el oxalato sódico. El fosfato es importante tanto para la etapa inicial de glucolisis (glucosa a G6P) y para la fosforilación del NMP a NTP. La reacción libre de células estaba limitada por el fosfato cuando se utilizaba glucosa como fuente de energía. Esta limitación no existía en las reacciones libres de células tradicionales que utilizan normalmente una fuente de energía fosforilada tal como el PEP, creatinina fosfato, o incluso G6P. Se descubrió que los experimentos que utilizan glucosa más fosfato daba rendimientos de proteína por encima de 400 μ g/ml, al compararse con los experimentos que utilizan G6P, que producen rendimientos de proteína por encima de 800 μ g/ml. Las reacciones con glucosa y NMP son beneficiosas debido a la disminución de los costes y el aumento de la estabilidad de estos reactivos.

También se utilizaron satisfactoriamente el piruvato, otra fuente de energía no fosforilada, en una reacción de síntesis de proteína libre de células con NMP solo cuando se añadió fosfato adicional. Se llevó a cabo una reacción discontinua de tres horas de la mezcla descrita anteriormente tras reemplazar la glucosa con piruvato y el NTP con NMP. La optimización con fosfato dio como resultado rendimientos cercanos a los de la cantidad obtenida con NTP (Figura 1) con una fracción del coste. Sin fosfato adicional, los rendimientos de síntesis de proteína eran sustancialmente menores.

Para determinar más las necesidades para esta nueva reacción, se investigaron individualmente los componentes de la reacción. Se determinó que las reacciones que utilizan NTP y glucosa como fuente de energía también se benefician del fosfato adicional (Figura 2), dando como resultado rendimientos similares que la reacción con NMP.

Se han llevado a cabo más experimentos para determinar otras etapas que son importantes en las reacciones satisfactorias. Se descubrió que la eliminación del PEG y el ácido oxálico, así como el control cuidadoso del pH por medio del uso del tampón apropiado tenían un impacto significativo en los rendimientos de proteína (Figura 3).

5 Anteriormente, las reacciones de síntesis de proteínas se limitaban por el uso de fuentes de energía fosforiladas y nucleótidos trifosfato. Estos compuestos son agentes relativamente caros en las reacciones libres de células. Además, las moléculas fosforiladas son más susceptibles a la degradación y crean un entorno de reacción variable con respecto a la concentración de fosfato inorgánico. Utilizando glucosa y nucleósidos monofosfato se aumentará la robustez de la reacción y la homeostasis a la vez que se disminuyen drásticamente los costes. De hecho, cuando se comparan el coste de las fuentes de energía y nucleótidos, la glucosa y NMP están cerca de dos órdenes de magnitud menos caros que el PEP y NTP (Tabla 1, Fila 1).

15 Los rendimientos de la síntesis de proteína de las reacciones de síntesis *in vitro* utilizando glucosa como fuente de energía y NMP son aproximadamente del 60 % de la reacción tradicional. Sin embargo, la gran ventaja en el coste de la utilización de glucosa y NMP compensa el ligero descenso del rendimiento tal que el rendimiento relativo del producto es casi noventa veces mejor basado en el coste (Tabla 1, Fila 3).

Tabla 1: Comparación de reacciones libres de células con varias fuentes de energía y nucleótidos

	NTP			NMP (+ fosfato)		
	PEP	G6P	Glucosa	PEP	G6P	Glucosa
Coste de la fuente de energía y nucleótidos (\$ / ml reacción)	1,88	0,73	0,61	1,28	0,13	0,0108
Rendimientos típicos (µg / ml)	700	800	430	700	960	470
Rendimiento relativo del producto (µg de proteína/\$)	1	2,9	1,9	1,5	19,6	116

20 Se llevaron a cabo reacciones libres de células adicionales como se ha descrito anteriormente con respecto a las condiciones de reacción, utilizando la cepa KC1 de *E. coli* como fuente del extracto (descrito por Michel-Reydellet et al. (2004) *Metab Eng* 6(3):197-203). Los datos de la concentración de ATP se obtuvieron tomando muestras a varios tiempos durante la reacción libre de células. La muestra se precipitó con un volumen igual (1:1) de ácido tricloroacético al 5 % (TCA) y se centrifugó durante 10 min a 14000 g. El sobrenadante se recogió y se analizó en un ensayo de luciferasa de luciérnaga para determinar la concentración de ATP (Kim y Swartz (2001), *supra*).

25 La Figura 4 es una comparación del sistema de glucosa como se ha descrito anteriormente, con NMP y NTP con o sin fosfato. Los datos de la Figura 4 demuestran que 10 mM de fosfato son beneficiosos para el sistema de glucosa. Además, estos datos muestran que los NMP pueden reemplazar los NTP sin impacto en los rendimientos de síntesis de proteínas.

30 Los datos de la Figura 5 muestran que el sistema libre de células que utilizan NMP puede regenerar el ATP necesario para la transcripción/traducción. De hecho, la concentración de ATP con NMP alcanza rápidamente el mismo nivel que se ve en la reacción de glucosa/NTP.

Ejemplo 2

Glutamato como fuente de energía

40 La mezcla de reacción para las reacciones de transcripción-traducción combinadas descrita posteriormente contiene los siguientes componentes: 1,2 mM de ATP, 0,85 mM de cada uno de GTP, UTP y CTP, 130 mM de glutamato potásico, 10 mM de glutamato amónico, 10 mM de glutamato magnésico, 1,5 mM de espermidina, 1 mM de putrescina, 34 µg/ml de ácido folínico, 170,6 µg/ml de mezcla de ARNt de *E. coli*, 13,3 µg/ml de plásmido, 100 µg/ml de ARN polimerasa T7, 2 mM de cada uno de 20 aminoácidos sin marcar, 5 µM de L-[U-¹⁴C] leucina, 0,33 mM de dinucleótido nicotinamida adenina, 0,26 mM de Coenzima A, 4,0 mM oxalato sódico y 0,24 volúmenes de extracto S30.

50 Se omitió el piruvato como fuente de energía. En esta situación, la suplementación de 10 mM de fosfato potásico, pH 7,2 (ajustado con ácido acético glacial), es beneficioso para la expresión proteica. Además de utilizar NTP (ATP, GTP, UTP y CTP), las reacciones también se pueden llevar a cabo con NMP (AMP, GMP, UMP y CMP) en las mismas concentraciones establecidas que las descritas anteriormente. Hay aproximadamente 3,3 mM de magnesio, 14,4 mM de potasio, 2,4 mM de Tris; pH 8,2, y 23,5 mM de acetato en cada reacción que se origina del extracto

celular. El extracto alcanza el 24 % del volumen de reacción, y se encuentra en su propio tampón de magnesio, potasio y acetato de tris. Por lo tanto este tampón aumenta la concentración de estos componentes cuando se añade a la reacción. Las concentraciones dadas anteriormente (3,3 mM, 14,4 mM, etc.) son las concentraciones finales una vez que ya se ha añadido el extracto. La mezcla de ARNt total de *E. coli* se obtuvo en Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). La L-[U-¹⁴C] leucina de Amersham Pharmacia Biotechnology (Uppsala, Suecia). Todos los demás agentes se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO).

La reacción de síntesis proteica libre de células se llevó a cabo utilizando un extracto S30 bruto derivado de *E. coli* K12 (cepa KC 1, genotipo A19 $\Delta tonA \Delta tnaA \Delta speA \Delta endA \Delta sdaA \Delta sdaB met+$). La preparación del extracto se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (Swartz et al. (2004). Cell-free protein synthesis with prokaryotic coupled transcription-translation. En: Balbas P, Lorence A, editores. Recombinant Protein Protocols: Methods in Molecular Biology Series: Volumen 267. Totowa, NJ: Humana Press Inc. p. 169-182). Se utilizó el plásmido pK7CAT como matriz para la síntesis proteica. El pK7CAT codifica la secuencia de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que utilizan el promotor y terminador T7. Se añadió la polimerasa T7, preparada como describen Swartz et al. (2004). La cantidad de proteína sintetizada se calcula por las radioactividades medidas de TCA insoluble utilizando un contador de centelleo líquido y por actividad enzimática (Shaw (1975) Methods Enzymol. 43:737-755).

El suplemento de fosfato muestra en el presente documento que beneficia significativamente los rendimientos de producción de proteínas en el sistema Cytomim impulsado por el metabolismo de glutamato y fosforilación oxidativa. Esto se describe en el contexto de la utilización de NTP o NMP. En el caso de NTP, los inventores observaron un aumento significativo en la producción de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (como se evaluó por la incorporación de [¹⁴C] leucina) tras 6 horas de expresión con respecto a las reacciones sin adición de fosfato (Fig. 6). La adición de fosfato aumenta los rendimientos también cuando se utilizaron nucleósidos trifosfato.

Para optimizar la expresión de CAT en el sistema glutamato/fosfato, se ensayó el efecto de la concentración de fosfato en las reacciones libres de células Cytomim (sin piruvato sódico). La producción de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se evaluó por la incorporación de [¹⁴C] leucina tras 6 horas de expresión con un intervalo de concentraciones de fosfato inicial. Los rendimientos más favorables de CAT se observaron con la adición de 10 mM de fosfato (Tabla 2).

Tabla 2

Fosfato añadido (mM)	Producción relativa de CAT
0	0,50 ± 0,10
4	0,74 ± 0,13
8	0,86 ± 0,04
10	1,00 ± 0,08
12	0,99 ± 0,05
16	0,93 ± 0,05

Tabla 1 – Estudios de optimización de fosfato en el sistema Cytomim basado en la expresión total de CAT. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando las condiciones del sistema Cytomim sin piruvato sódico y con NTP. Se incubaron reacciones de quince microlitros a 37 °C durante 6 horas. Se utilizó fosfato potásico (dibásico, Mallinckrodt: Phillipsburg, NJ), ajustado a un pH de 7,25 con ácido acético glacial.

Para caracterizar más esta nueva estrategia que explota el metabolismo del glutamato, NTP, y suplementación de fosfato, se cuantificó la acumulación de CAT con el tiempo como se determinó por la radioactividad del TCA precipitado y la actividad enzimática. El rendimiento final de CAT tras seis horas de incubación era de 802 ± 48 µg/ml (Fig. 7). La fracción soluble y activa de CAT era aproximadamente de 70 ± 3 % (Fig. 2). Debido al bajo coste de la adición del fosfato potásico (0,00016 \$/ml de volumen de reacción de fosfato potásico 10 mM), los rendimientos de producción suplementada con 10 mM de fosfato aumentaron un 33 % sin impacto en el coste de los materiales madre de la reacción.

Para demostrar la utilidad del nuevo sistema de glutamato y fosfato, se llevaron a cabo reacciones de 1 ml en una columna de burbujas cubierta. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción-traducción combinadas, mantenidas a 37 °C durante 5 horas utilizando las condiciones del Cytomim (sin piruvato, con NTP y suplementado con 10 mM de fosfato), excepto que la reacción se suplementó con 0,007 % (v/v) de antiespuma Sigma 0-30. Este agente se utilizó para controlar la formación de espuma. Además, se suministraron burbujas de oxígeno puro, de aproximadamente 0,25 cm de diámetro, desde el fondo de la cámara de reacción libre de células a una tasa de 2 burbujas por segundo para suministrar el oxígeno necesario para la regeneración de ATP. En cada punto de tiempo, se tomaron muestras para cuantificar la cantidad de CAT total, que se determinó por la incorporación de ¹⁴C-leucina. La Figura 8

muestra la acumulación media de CAT (~ 900 µg/ml) de dos experimentos separados. Con respecto a las reacciones de 15 µl discontinuas (Fig. 7), el formato de columna de burbujas tiene una tasa más rápida de síntesis de proteínas.

5 Para cuantificar el impacto del intercambio de NMP por NTP, se midió la expresión de CAT en el nuevo sistema (glutamato/10 mM de fosfato) con o NMP o NTP a las concentraciones iniciales de referencia. Se llevaron a cabo las reacciones de síntesis proteica durante 6 horas y se tomaron muestras para cuantificar la acumulación de CAT. Se observó un 22 % de disminución del rendimiento utilizando NMP respecto a NTP (Fig. 9). Aunque los rendimientos totales se reducían, el coste beneficio de la utilización de nucleósidos monofosfato da como resultado un rendimiento de producción significativamente más alto (miligramos de proteína por dólar de fuente de energía y nucleótidos) al compararse con las reacciones con NTP (Tabla 3).

10 También se examinó el efecto de un intervalo de concentraciones de fosfato sobre los rendimientos de expresión de proteínas en las reacciones con NMP. De acuerdo con los datos anteriores se demostraba que las reacciones de síntesis proteica libre de células que explotan los NMP estaban limitadas por el fosfato, el suministro de fosfato era crítica para altos rendimientos. La concentración óptima de fosfato era de 10 mM. Con la adición de 10 mM de fosfato, los rendimientos aumentaban más de un 400 % con respecto a las reacciones libres de células sin fosfato (Fig. 10).

20 **Tabla 3 – 1 cifras puestas al día con los precios actuales. Ahora coinciden con la Tabla 1**

Sistema	Tamaño de la reacción	Fuente de energía y nucleótidos	Duración de síntesis (h)	CAT producida (mg/ml)	Coste de la fuente de energía y nucleótidos (\$/ml reacción)	mg de proteína/ (\$ fuente de energía y nucleótidos)
PANOx-SP	15 µl	PEP, NTP	3	0,70	1,88	0,37
Cytomim	15 µl	Glutamato, fosfato, NTP	6	0,80	0,61	1,31
Cytomim	15 µl	Glutamato, fosfato, NMP	6	0,62	0,0104	59

Tabla 3 – Rendimientos de producto (mg de proteína/\$ coste de fuente de energía y nucleótidos) para los sistemas PANOx-SP (con NTP), Cytomim (sin piruvato, con fosfato y NTP) y Cytomim (sin piruvato, con fosfato y NMP).

25 Aquí, el suplemento de fosfato ha demostrado que aumenta los rendimientos de síntesis de proteínas un 33 % en una reacción de síntesis proteica libre de células impulsado por glutamato. Además, para incrementar la utilidad de este sistema aumentando los rendimientos, se aumentan los rendimientos sin afectar la rentabilidad total de los materiales básicos (coste de reactivos). En particular, las reacciones libres de células impulsadas por el metabolismo de glutamato aumentan más de 4 veces con respecto a las reacciones sin fosfato.

30 Como resultado del aumento del rendimiento por el suplemento de fosfato, los dos costes de reactivos dominantes (sustratos de energía y nucleótidos) que se asocian con reacciones libres de células se pueden reducir más de dos órdenes de magnitud (aumento de 160 veces (5910,37)) a partir de la estrategia PANOx-SP convencional utilizando reacciones libres de células impulsadas por metabolismo de glutamato y fosforilación oxidativa con el suplemento de concentraciones bajas de fosfato y la sustitución de NMP por NTP (Tabla 3). Estos resultados muestran la viabilidad económica de la síntesis proteica ADNr libre de células. No es necesario añadir cofactores exógenos a esta nueva tecnología. Los compuestos tales como dinucleótido nicotinamida adenina (NADH), NAD⁺, o acetil- coenzima A se pueden utilizar para suplementar los rendimientos de síntesis proteica pero no son necesarios.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de ARNm, ADN y/o polipéptidos en una mezcla de reacción libre de células que comprende un extracto celular de bacterias cultivadas en un medio que contiene glucosa y fosfato y/o es de *E. coli*,
5 una matriz para la producción de ARNm, ADN y/o polipéptidos; monómeros para sintetizar ARNm, ADN y/o polipéptidos, y tales co-factores, enzimas y otros reactivos que sean necesarios para la síntesis, en donde dicha mezcla de reacción está libre de polietilen glicol y comprende uno o más de entre espermina, espermidina y putrescina; comprendiendo el método:
- 10 la síntesis de dicho ARNm, ADN y/o polipéptidos en la mezcla de reacción libre de células, modificada para incluir:
- 15 al menos 10 mM y no más de 250 mM de una fuente de energía libre de fosfato; nucleósidos monofosfato en ausencia de nucleósidos trifosfato exógenos; y fosfato exógeno a una concentración de al menos 1 mM y no más de 20 mM.
2. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha fuente de energía libre de fosfato es glucosa.
3. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha fuente de energía libre de fosfato es glutamato.
20
4. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha fuente de energía libre de fosfato es piruvato.
5. El método de la Reivindicación 1, en el que dicho fosfato se proporciona como fosfato potásico, fosfato magnésico o fosfato amónico.
25
6. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha síntesis comprende la traducción de ARNm para producir polipéptidos.
7. El método de la Reivindicación 6, en el que dicha síntesis también comprende la transcripción de ARNm a partir de una matriz ADN.
30
8. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha síntesis de ARNm, ADN y/o polipéptidos se lleva a cabo como una reacción discontinua.
- 35 9. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha síntesis de ARNm, ADN y/o polipéptidos se lleva a cabo como una reacción continua.
10. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende un extracto de *E. coli* que se cultiva en un medio que contiene glucosa.
40
11. El método de la Reivindicación 10, en el que dicha *E. coli* se cultiva en un medio que contiene glucosa y fosfato.
12. El método de la Reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende magnesio a una concentración desde 5 mM a 20 mM.
45
13. El método de la Reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción da un rendimiento por encima de 400 µg/ml del polipéptido que se sintetiza.

Figura 1: Proteína que se produce en reacciones libres de células

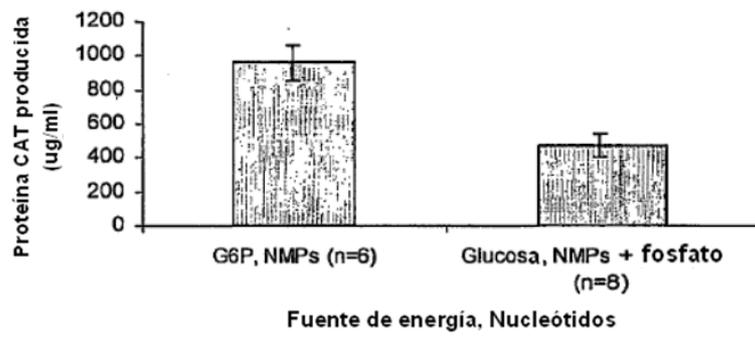


Figura 2: Adición de fosfato a las reacciones libres de células utilizando glucosa como fuente de energía

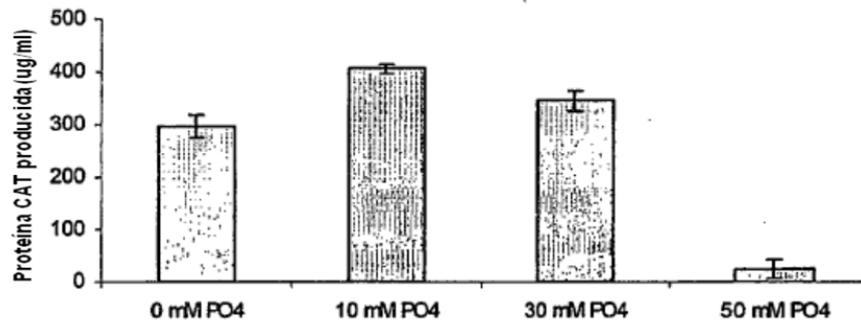
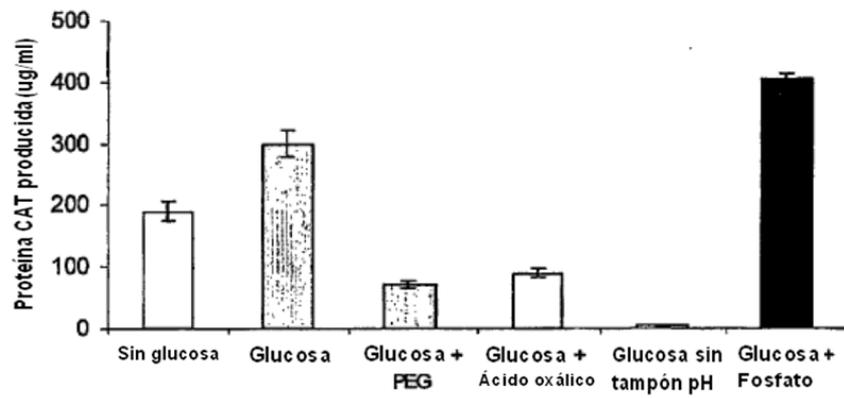


Figura 3: Componentes importantes para las reacciones libres de células satisfactorias que utilizan glucosa



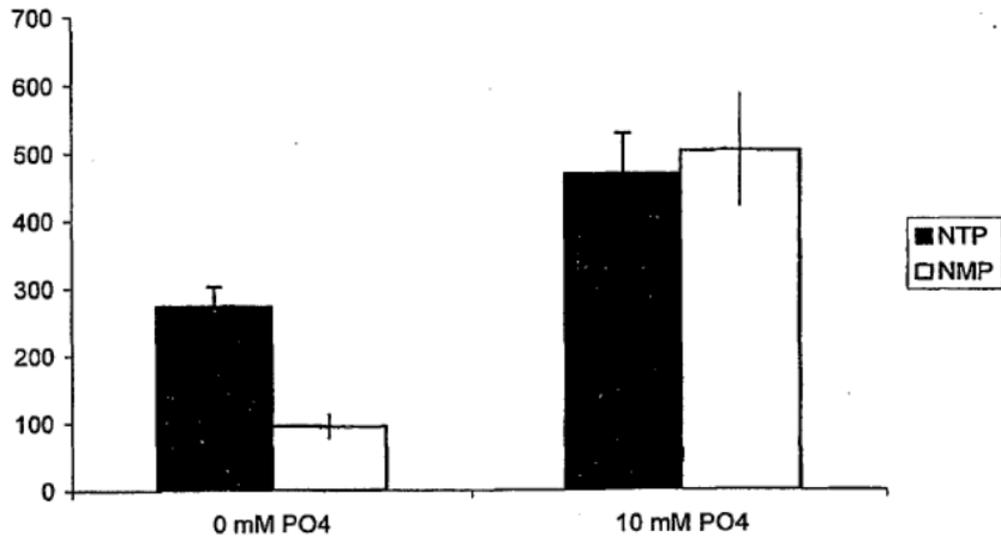


Figura 4

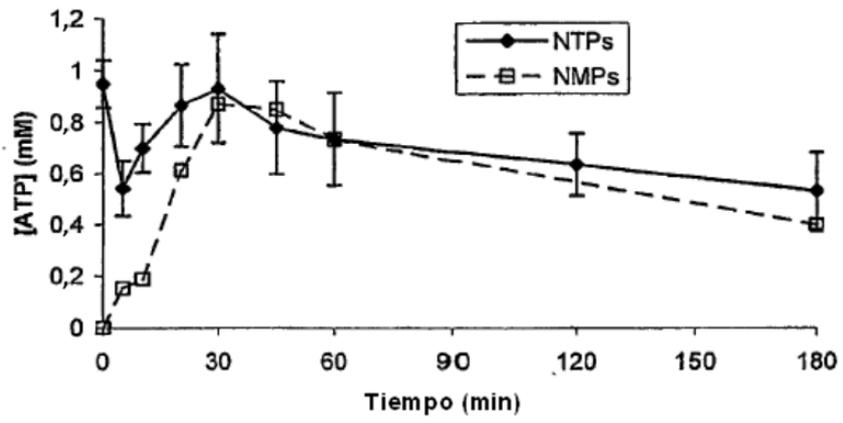


FIGURA 5

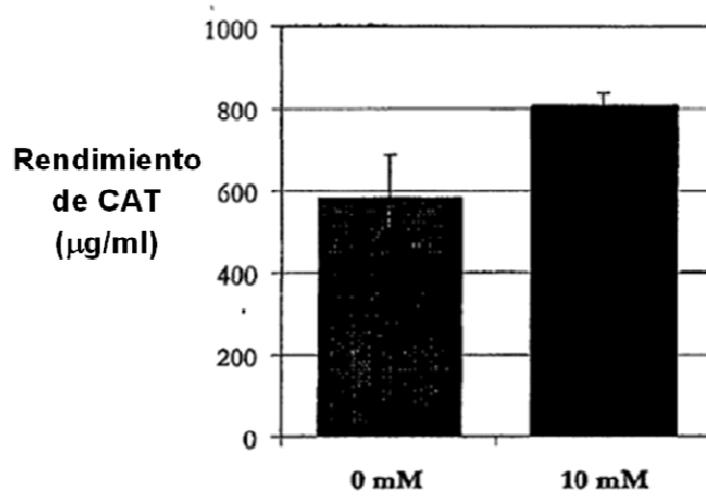


FIGURA 6

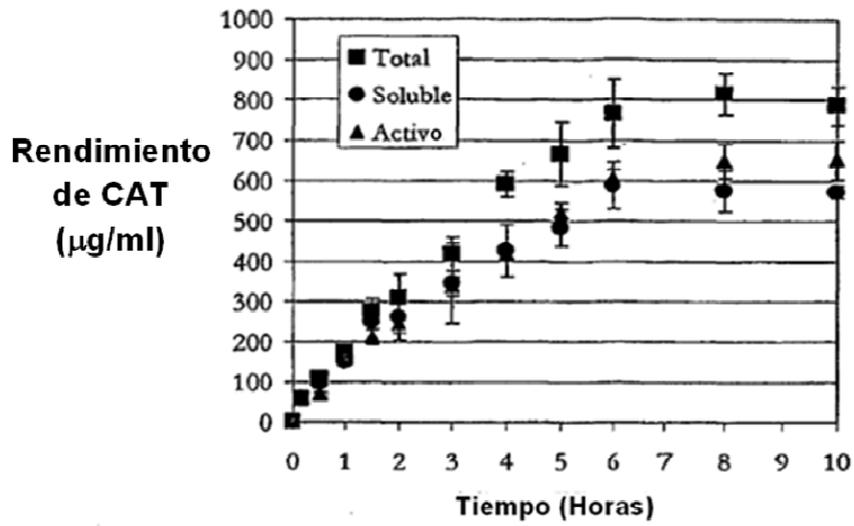


FIGURA 7

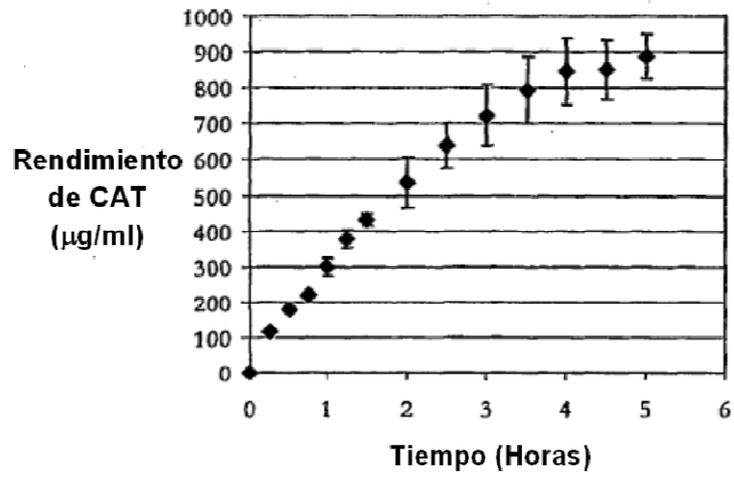


FIGURA 8

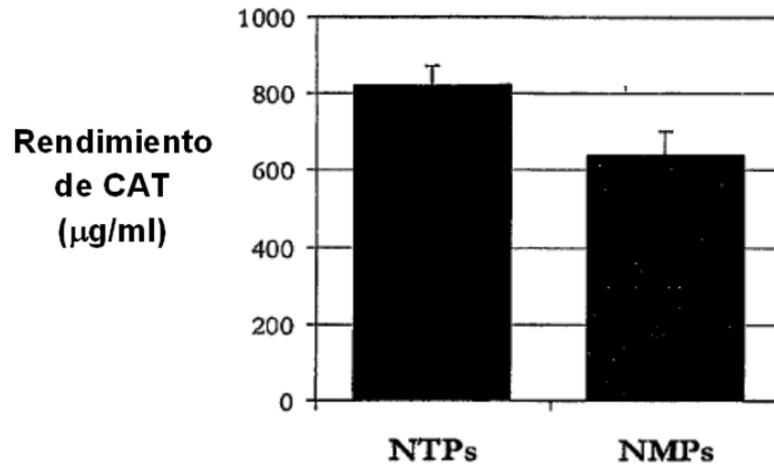


FIGURA 9

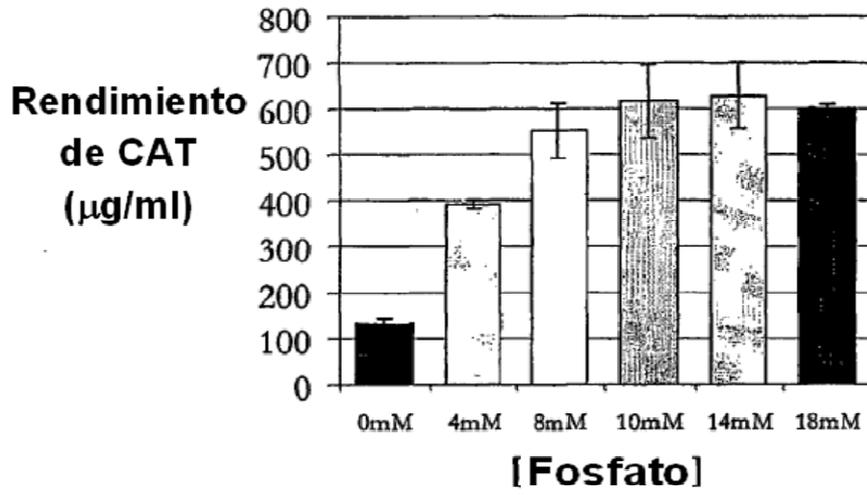


FIGURA 10