

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 788**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2011 PCT/EP2011/061241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2011 E 11728885 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2591121**

54 Título: **Línea celular para producción**

30 Prioridad:

**05.07.2010 EP 10168446**

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

**04.04.2018**

73 Titular/es:

**LONZA LTD (100.0%)  
Lonzastrasse  
3930 Visp , CH**

72 Inventor/es:

**MATTANOVICH, DIETHARD;  
DRAGOSITS, MARTIN;  
GASSER, BRIGITTE;  
MAURER, MICHAEL y  
SAUER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 661 788 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

Línea celular para producción

La invención se refiere a un método para la preparación de una línea celular muy productora para la producción de un polipéptido de interés (PDI) en un cultivo celular.

## 5 Antecedentes

El desarrollo de las técnicas del ADN recombinado ha permitido la utilización de diversos microorganismos como anfitriones para la expresión de proteínas heterólogas con aplicación farmacéutica e industrial.

- Para la producción de dichas proteínas heterólogas se utilizan hoy en día muchas células anfitrionas diferentes. La producción satisfactoria de proteínas biotecnológicas se ha realizado con anfitriones eucariotas. Los ejemplos más destacados son las levaduras en gemación como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Hansenula polymorpha*, hongos filamentosos como *Aspergillus awamori* o *Trichoderma reesei*, o células de mamíferos como p. ej. células CHO. Los mecanismos de plegamiento de proteínas en varios sistemas y el impacto de respuestas al estrés en procesos industriales de producción de proteínas son expuestos por Gasser *et al.* (*Microbial Cell Factories* 2008, 7:11).
- 15 Las levaduras son anfitriones atractivos para la producción de proteínas biotecnológicas y pequeños metabolitos. *Pichia pastoris*, levadura metilotrófica, se utiliza frecuentemente como sistema de expresión para la producción de proteínas biotecnológicas, y más recientemente también para la producción de pequeños metabolitos (Marx *et al. Microb. Cell Fact.* 7:23 (2008)). *Pichia* tiene una gran tasa de crecimiento y es capaz célula crecer en un medio sencillo y barato. *Pichia* puede crecer en matraces en agitación o en un fermentador, lo que la hace adecuada tanto para la producción a pequeña como a gran escala. *Pichia pastoris* ha sido recientemente reclasificada en un nuevo género, *Komagataella*, y ha sido separada en tres nuevas especies: *Komagataella pastoris*, *K. phaffii* y *K.pseudopastoris* (Kurtzman C.P. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 973-976 (2005)). Por lo tanto, *Pichia pastoris* es un sinónimo de las tres especies, *K. pastoris*, *K. phaffii* y *K.pseudopastoris*. Según la bibliografía anterior, *Pichia pastoris* se utiliza en todo este texto, significando implícitamente cualquiera de las especies *Komagataella*.
- 20 25 Asimismo, son sinónimos *Hansenula polymorpha*.

- En la mayoría de los casos, para producción industrial se cultivan células anfitrionas en procesos alimentados por lotes. La productividad total de dicho proceso es función del total de biomasa a lo largo del tiempo y de la productividad específica ( $q_P$ ) de la biomasa.  $q_P$  se correlaciona con la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), normalmente aumentando continuamente con  $\mu$  creciente. Por lo tanto, se consigue alta  $q_P$  a alta  $\mu$ , mientras que la biomasa-tiempo total (A) óptima se consigue con  $\mu$  inicial alta y a continuación muy baja. Esto se refleja mediante la fórmula siguiente para calcular el rendimiento del producto (P) a  $q_P$  constante:
- 30

$$P = A \cdot q_P$$

La figura 1 presenta la relación de  $q_P$  y  $\mu$  en *P. pastoris* (Maurer *et al.* 2006, *Micr. Cell Fact.* 5:37 doi:10.1186/1475-2859-5-37).

- 35 Por consiguiente la productividad óptima se consigue con un compromiso de  $\mu$ , normalmente controlada en alimentación discontinua por alimentación limitada de sustratos.

- Un caso típico de proceso alimentado en discontinuo es la producción de proteínas recombinantes con microorganismos o células de mamíferos. Si bien la descripción de la concentración del producto en la masa celular es bastante directa en el caso de un producto intracelular, es más complejo predecir la cinética de un producto segregado. Un caso típico para los sistemas de secreción son las levaduras biotecnológicas. Como la producción de muchas proteínas en las levaduras es bastante sensible a los costes, se realizan esfuerzos para predecir y controlar la productividad, el tiempo de proceso y los títulos de los productos. Se han descrito métodos para optimizar los procesos alimentados en discontinuo para la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Zhang *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 2005, 21: 386-393, Maurer *et al.*, 2006, *Micr. Cell Fact.*).
- 40

- 45 Los costes variables de un bioproceso se correlacionan con la capacidad volumétrica de la unidad de fermentación requerida y el tiempo de proceso que requiere esta unidad para producir una cantidad definida del producto. Por lo tanto, la productividad volumétrica  $Q_P$  es el objetivo más plausible para la optimización. En un punto de tiempo  $t$  del proceso dado,  $Q_P$  se define como:

$$Q_P = P / (V \cdot t)$$

- 50 El ciclo celular, o ciclo de división celular, es la serie de episodios que tiene lugar en una célula que conduce a su división y duplicación (replicación).

La división de células eucarióticas avanza a través de un ciclo celular muy regulado que comprende fases consecutivas denominadas G1 (espacio 1), S (síntesis), G2 (espacio 2) y M (mitosis).

- La fase G0 se denomina fase de reposo, donde las células en reposo, en determinadas circunstancias o después de recibir estímulos específicos, inician la síntesis de ARN y proteínas (fase G1) que son necesarias para llevar a cabo la multiplicación de su ADN y la división de la célula en dos células hijas. Posteriormente, comienza la síntesis de ADN (fase S); una vez que la célula ha duplicado su ADN, comienza un segundo período tardío de síntesis de proteínas (fase G2), que es la fase corta que prepara la célula para la división (fase M). Las fases G2 y M se caracterizan por el conjunto de cromosomas dobles y, a menudo, se consideran juntas como fase G2+M.
- 5
- Durante la breve fase de la mitosis, la célula eucariótica separa los cromosomas en su núcleo celular en dos conjuntos idénticos en dos núcleos hijas. La mitosis generalmente es seguida inmediatamente por citocinesis, separando el citoplasma en dos células hijas para proporcionar partes iguales de los componentes celulares.
- 10
- Después de la división celular, cada una de las células hijas comienza la interfase de un nuevo ciclo. Se dice que las células que han dejado de dividirse, temporalmente o no, han entrado en un estado de inactividad o senescencia (G0).
- El avance del ciclo celular está estrechamente regulado por la expresión temporal y espacial definida, la localización y la destrucción de varios reguladores del ciclo celular, que presentan un comportamiento muy dinámico durante el ciclo celular. Por ejemplo, en fases específicas del ciclo celular, algunas proteínas se trasladan del núcleo al citoplasma, o viceversa, y algunas se degradan rápidamente. Para detalles de conocidos componentes e interacciones del control del ciclo celular, véase Alberghina L, Coccetti P, Orlandi I. Systems biology of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*: From network mining to system-level properties. *Biotechnol Adv.* 2009 nov.-dic.; 27(6):960-78. El proceso del ciclo celular es complejo y está muy regulado. Los errores en el ciclo celular pueden matar la célula a través de la apoptosis o pueden conducir a la división celular incontrolada y, en algunos casos, al cáncer.
- 15
- 20
- El análisis del ciclo celular, principalmente mediante el estudio de la distribución de células en todas las fases del ciclo celular G0/G1, S y G2/M, ha demostrado ser de utilidad en el análisis de muestras tumorales y el estudio de la respuesta proliferativa a diferentes estímulos así como en otras áreas.
- 25
- El momento y la interdependencia de la replicación del ADN (fase S) y la mitosis (fase M) se controlan mediante oscilaciones en las actividades de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Los eucariotas superiores tienen múltiples Cdk, mientras que en las levaduras, el avance del ciclo celular requiere una sola Cdk conocida como Cdc2 en la levadura de fisión y Cdc28 en la levadura en gemación. Las ondas de actividades de cinasas están determinadas en gran medida por la síntesis y degradación dependiente del ciclo celular de subunidades de ciclina reguladoras de Cdk. La entrada en la fase M depende de la aparición de ciclinas de tipo B cuya actividad de cinasa asociada favorece la formación del huso mitótico. En la levadura en gemación, dos pares de ciclinas de tipo B relacionadas que aparecen durante la fase S (Clb3,4) y G2 (Clb1,2) intervienen en la formación y el alargamiento del huso.
- 30
- Cross *et al.* (*Molecular Biology of the Cell* (2005) 16:2129-2138) describen un comportamiento cuantitativo del sistema de control del ciclo celular eucariótico dependiendo del nivel de expresión de Clb2. Se predijo una pérdida de robustez de un sistema de sobreexpresión de Clb2.
- 35
- Uchiyama *et al.* (*Journal of Biotechnology* 1999, 71(1-3):133-141) investigaron la eficiencia del control de población del ciclo celular basándose en un modelo matemático sencillo de dependencia del ciclo celular de producción de  $\alpha$ -amilasa del arroz por una levadura biotecnológica y describieron una modesta mejora de la producción de proteínas al aumentar la proporción de células en fase M.
- 40
- Se describió una serie de reguladores fúngicos, incluidos los reguladores del ciclo celular, para mejorar el rendimiento de la producción de metabolitos fúngicos (documento WO01/29073).
- En un esfuerzo por mejorar la expresión de proteínas a partir de una p21 biotecnológica de la línea celular productora u otra proteína inhibidora del ciclo celular se ha coexpresado para mejorar la productividad de células individuales (documento WO02/099100A2). p21 es un inhibidor universal de las ciclinas cinasas que confiere la interrupción estable y cuantitativa del ciclo celular. Por lo tanto, se debe tener cuidado para evitar desencadenar la muerte celular o apoptosis además de su efecto citostático.
- 45
- El documento WO00/09714A1 describe la sobreexpresión de ciclina D humana en células de ovario de hámster chino (CHO) y su efecto sobre el nivel de producción de albúmina sérica humana. Específicamente, el documento WO00/09714A1 informa que la sobreexpresión de ciclina D humana en las células CHO produce un aumento de la población celular en la fase S.
- 50
- También se ha examinado el efecto sobre la fase del ciclo celular en el contenido de IgG asociado a la superficie de las células de hibridoma murino, demostrando que el contenido de IgG es mayor en la fase G2+M (Cherlet *et al.* *Biotechnology and Bioengineering* 1995, 47(5): 535-540).
- 55
- El documento WO0216590A2 describe la extensión de la biosíntesis de proteínas de un cultivo celular al cambiar las células desde un estado replicativo a otro productivo (interruptor RP), que es un estado seudosenescente. Esto

puede conseguirse mediante células transformadas que expresan condicionalmente un bloqueador del ciclo celular que detiene la división celular. Al evitar la proliferación celular induciendo la diferenciación a un estado seudosenescente, se obtendrían mayores rendimientos de bioproductos.

5 Se pueden usar varios métodos para sincronizar cultivos celulares deteniendo el ciclo celular en una fase determinada, o separando células de diferentes fases. Por ejemplo, la falta de suero o la adición de factor alfa detendrían la célula en la fase G1, la sacudida mitótica, el tratamiento con colquicina y el tratamiento con nocodazol detienen la célula en fase M y el tratamiento con 5-fluorodesoxiuridina detiene la célula en fase S.

10 Una medida común para prolongar la fase de producción de un cultivo celular es la limitación de los sustratos una vez que la biomasa ha crecido hasta cierto punto. Del mismo modo, se describe que los aditivos a los medios de cultivo influyen en el ciclo celular. KR100254810B1 describe la adición del antibiótico novobiocina a un cultivo de células CHO para aumentar la producción de eritropoyetina biotecnológica. La novobiocina sirve como inhibidor de las fases iniciales (pre-M) del ciclo celular.

15 Uchiyama *et al.* (*Biotechnol. Bioeng.* 54:262-271 (1997)) describen cultivos síncronos y detenidos de *Saccharomyces cerevisiae*. Se provocó sincronía utilizando tanto mutantes cdc sensibles a la temperatura como inhibidores para detener el avance del ciclo celular para estudiar la dependencia del ciclo celular. El ciclo celular se detuvo al cambiar la temperatura de una permisiva a otra represiva o bien mediante la adición de un inhibidor del ciclo celular.

20 El bloqueo universal del crecimiento y la proliferación celular podría conducir de manera efectiva a un paro celular y apoptosis precoz, dando como resultado un corto período de producción del cultivo celular. En general, la productividad prolongada en ausencia de crecimiento celular difícilmente se puede mantener con la tecnología más avanzada.

Es objetivo de la presente invención prolongar una fase altamente productiva de un cultivo celular para aumentar el rendimiento de bioproductos.

#### **Compendio de la invención**

25 El objeto se consigue mediante la provisión de las realizaciones de la presente solicitud.

Según la invención, se proporciona un método de producción de un polipéptido de interés (PDI) en un cultivo celular, que comprende modificar genéticamente una línea celular fúngica para sobreexpresar un regulador del ciclo celular, que es una ciclina G2/mitótica específica, que produce específicamente la prolongación de la fase del ciclo celular G2+M en un cultivo celular, seguida de la producción del PDI, que es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.

Específicamente, la línea celular fúngica de los métodos de la invención ha integrado de manera estable en su genoma un casete de expresión para expresar una ciclina G2/mitótica específica. Preferiblemente, la ciclina G2/mitótica específica es Clb2 o Clb1.

35 Según una realización específica de la invención, la línea celular es una línea de células anfitrionas comodín o una línea celular productora que está diseñada para producir una ciclina G2/mitótica específica y un PDI.

El método proporcionado en la presente memoria es para producir un polipéptido de interés (PDI) recombinante en un cultivo celular, que comprende modificar genéticamente una línea celular eucariótica:

- para producir específicamente la prolongación de la fase del ciclo celular G2+M en una fase de precultivo, y

- para producir el PDI en una fase de producción después de la fase de precultivo.

40 El cultivo celular (es decir, la línea celular en cultivo) en la fase de precultivo sirve particularmente para hacer crecer las células y establecer la fase del ciclo celular G2+M como un estado estacionario. Al cambiar las condiciones de cultivo celular a la fase de producción, que también se denomina en la presente memoria "fase de producción", el PDI recombinante y eventualmente los metabolitos respectivos mediados por dicho PDI, se producen de manera eficaz, manteniendo aún el ventajoso estado del ciclo celular G2+M. Por lo tanto, el método de cultivo por etapas proporciona de manera eficaz para ambos, el enriquecimiento del cultivo celular para las células capaces de producir un alto rendimiento de PDI en la primera etapa, y la producción del PDI en la segunda etapa.

En la presente memoria se describe específicamente una línea celular que tiene integrado de manera estable en su genoma un casete de expresión para expresar un modulador del ciclo celular.

50 Preferiblemente, la línea celular se diseña para modular un regulador del ciclo celular, preferiblemente sobreexpresando específicamente, activando, mutando, degradando, eliminando, degradando o inhibiendo un regulador del ciclo celular.

Los reguladores del ciclo celular preferidos utilizados en la presente memoria se seleccionan del grupo que consiste

en los complejos Cdk / ciclina tales como las cinasas dependientes de ciclina (Cdk), las ciclinas G1 específicas, las ciclinas G2/específicas mitóticas y sus factores de transcripción o degradación, tales como Clb2, Clb1, Clb3-6, Cln1-3, Cdc6, Cdc14, Cdc20, Cdc28, Cdc48, Cdh1, Kar1, Mad2, MBF, Mcm1, Pds1, Rrp42, SBF, Sic1, Swe1, Swi5, Whi2.

5 Según una realización específica, dicha línea celular es una línea de células anfitrionas comodín o una línea celular productora que está diseñada para producir un modulador del ciclo celular y dicho PDI.

Los PDI específicamente preferidos se seleccionan del grupo que consiste en proteínas séricas, tales como una inmunoglobulina o albúmina sérica, enzimas, hormonas, moléculas señalizadoras, proteínas de la matriz, uno de sus fragmentos o derivados, o un polipéptido que media la producción de un metabolito de la célula anfitriona.

10 La línea de células fúngicas utilizada según la invención preferiblemente es una célula de levadura, tal como una célula de género *Pichia*, en particular una célula de una cepa de *P. pastoris*.

La invención proporciona además la línea de células fúngicas muy productora que comprende un gen recombinado de interés que codifica un PDI, que es una proteína o polipéptido heterólogo, cuya línea celular ha integrado de manera estable en su genoma un casete de expresión para expresar un regulador del ciclo celular que produce la prolongación de la fase del ciclo celular G2+M en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica, y tiene una productividad específica  $q_P$  de al menos  $0,1 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$  para producir dicho PDI, preferiblemente al menos  $0,1 \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , más preferido al menos  $1 \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , p. ej. en casos de enzimas industriales o técnicas, en un cultivo celular en condiciones de producción a escala industrial.

15

La invención proporciona además el cultivo de células fúngicas muy productivo que comprende un gen recombinado de interés que codifica un PDI, que es una proteína o polipéptido heterólogo, cuya línea celular ha integrado de manera estable en su genoma un casete de expresión para expresar un regulador del ciclo celular que produce la prolongación de la fase del ciclo celular G2+M en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica, en donde al menos el 50% de las células se encuentran en la fase G2+M durante un tiempo de proceso que es al menos el 50% del tiempo de alimentación.

20

Específicamente, el cultivo celular puede mantenerse de manera estable en estado estacionario tal como la distribución G2+M durante un período de al menos 10 horas.

25

Según aspectos específicos, el cultivo celular es un cultivo celular discontinuo o continuo.

En una realización particularmente preferida, el cultivo celular de la invención tiene una  $Q_P$  de productividad volumétrica de al menos  $0,1 \mu\text{g}/(\text{l}\cdot\text{h})$ , preferiblemente al menos  $10 \text{m}\mu/(\text{l}\cdot\text{h})$ , más preferido al menos  $0,1 \text{mg}/(\text{l}\cdot\text{h})$ , incluso más preferido al menos  $1 \text{mg}/(\text{l}\cdot\text{h})$ , p. ej. en casos de enzimas industriales o técnicas, normalmente en condiciones de producción a escala industrial, p. ej. empleando cultivo con alimentación discontinua en volúmenes de reactor de  $100 \text{l}$  a  $10 \text{m}^3$  o más, empleando tiempos de proceso típicos de varios días, o procesos continuos en volúmenes de fermentador de aprox.  $50\text{-}1.000 \text{l}$  o más, con tasas de dilución de aprox.  $0,05\text{-}0,15 \text{h}^{-1}$ . Según la invención, se proporciona además un método para aumentar el rendimiento de una producción de PDI recombinante en un cultivo celular, que comprende:

30

35 a) diseñar genéticamente una línea celular para la producción de hongos para sobreexpresar un regulador del ciclo celular que produce prolongación de la fase del ciclo celular G2+M, que es una ciclina G2/mitótica específica,

b) cultivar dicha línea celular de producción para obtener un cultivo celular en estado estacionario con una fase prolongada del ciclo celular G2+M,

c) seguido de cultivar dicho cultivo celular en estado estacionario para producir el PDI, y

40 d) recoger una fracción del cultivo celular que contiene el PDI, en donde el PDI es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.

El cultivo de células de producción en la fase de producción a veces se denomina cultivo principal; se proporciona un ejemplo en el apartado de ejemplos más adelante.

Según un aspecto más de la invención, se proporciona un método para prolongar la fase de producción para producir un PDI recombinante, es decir, una fase de producción de PDI recombinante de una línea celular de producción fúngica en un cultivo celular, que comprende modificar genéticamente la línea celular para sobreexpresar un regulador del ciclo celular que ocasiona la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, que es una ciclina G2/ mitótica específica, y en donde el PDI es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.

45

## Figuras

50 Fig. 1: Relación de  $q_P$  y  $\mu$  en *P. pastoris*.

Línea inferior: relación real en celdas naturales. Línea superior: relación óptima para la mayor productividad.

Esta figura muestra la relación funcional de la productividad específica de la expresión de Fab y el crecimiento celular en un cultivo celular de *P. pastoris*. La pendiente de la curva indica la relación de  $q_P$  a  $\mu$  a una  $\mu$  dada y es una medida para el valor del producto que se puede conseguir en este  $\mu$  dado. Por lo tanto, el rendimiento óptimo se puede conseguir con una tasa de crecimiento inicial alta seguida de un estado estacionario de la fase de producción durante un período prolongado de tiempo.

Fig. 2: Relación de  $q_P$ ,  $\mu$  y distribución del ciclo celular en *P. pastoris*.

$q_P$  (línea negra) depende de  $\mu$  según una función de Monod. Las fracciones de las células en la fase G1 (conjunto de cromosoma único, barra izquierda) y fase G2+M (al menos conjunto de cromosomas dobles, barra derecha) indican una correlación positiva de  $q_P$  con la fase G2+M.

Fig. 3: Relación de  $q_P$  y  $\mu$  en *P. pastoris* modificada genéticamente. Cuadrados: referencia (cepa natural). Triángulos: relación mejorada de la cepa de sobreexpresión de Clb2.

Fig. 4: Relación de  $\mu$  y la distribución del ciclo celular en *P. pastoris* modificada genéticamente. Barras de la izquierda: fracción de células en fase G1, barras a la derecha: fracción de células en fase G2+M.

### Descripción detallada

Por lo tanto, se describe en la presente memoria el efecto ventajoso de que una prolongación específica de la fase G2+M o un aumento relativo del número de células eucariotas en la fase G2+M dentro de un cultivo celular proporciona un dispositivo de bioplanta muy productivo para producir un PDI. Esto se efectúa modificando genéticamente una línea celular para obtener una línea celular biotecnológica con una modificación genómica que expresaría de forma estable una molécula efectora que origina dicha prolongación de la fase G2+M del ciclo celular. Sorprendentemente resultó que un cultivo celular respectivo podría producir establemente un PDI con altos rendimientos a una baja tasa de crecimiento específico, con lo que aumenta el rendimiento volumétrico. Por lo tanto, la línea celular productora descrita en la presente memoria no solo será útil en un proceso alimentado por lotes, sino también en un proceso de producción continua, donde se mantiene el cultivo celular de modo que la fracción de células G2+M se mantiene a un alto nivel durante un tiempo de producción prolongado.

La expresión "modulador del ciclo celular" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a moléculas efectoras que regulan por incremento o inhibidores del ciclo celular que se regulan por disminución, cinasas u otras enzimas o cofactores del sistema de control del ciclo celular. La expresión incluirá reguladores de ciclo celular y también se referirá a agonistas o antagonistas, activadores o inhibidores de dichas moléculas efectoras, inhibidores del ciclo celular o las respectivas enzimas, que participan activamente en el proceso del ciclo celular. Moduladores del ciclo celular pueden ser efectores fisiológicos de los mecanismos de control del ciclo celular, agentes sintéticos o químicos, o sustancias biológicas con una actividad moduladora comprobada. Por lo tanto, los moduladores del ciclo celular tienen efectos directos o indirectos sobre la regulación del ciclo celular. Dichos compuestos pueden derivarse por parte de un experto en la técnica anterior, y eventualmente probarse por sus efectos sobre el ciclo de células eucariotas por medios normales.

La expresión "regulador del ciclo celular" se referirá a sustancias fisiológicas, opcionalmente endógenas, activamente implicadas en el control del ciclo celular de una célula eucariota.

La expresión "línea celular" se referirá a un clon conocido de un tipo de célula determinado que ha adquirido la capacidad de proliferar durante un período prolongado. La expresión "línea celular anfitriona" se refiere a una línea celular utilizada para expresar un gen recombinante para producir polipéptidos o metabolitos celulares mediados por dichos polipéptidos. Una línea celular anfitriona de producción se entiende normalmente que es una línea celular lista para usar para el cultivo en un biorreactor para obtener el producto génico en un proceso de producción.

El término "expresión" o la expresión "sistema de expresión" o "casete de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en enlace operable, de modo que los anfitriones transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede integrarse en el cromosoma del anfitrión.

Los "vectores de expresión" o "vectores" utilizados en la presente memoria se definen como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de secuencias de nucleótidos biotecnológicas clonadas, es decir, de genes recombinados y la traducción de su ARNm en un organismo anfitrión adecuado. Dichos vectores de expresión generalmente comprenden un origen para la replicación autónoma en las células anfitrionas, marcadores seleccionables (p. ej., un gen de síntesis de aminoácidos o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), varios sitios de escisión de enzimas de restricción, una secuencia activadora adecuada y un terminador de transcripción, cuyos componentes están unidos operativamente. Los términos plásmido y vector como se emplean en la presente memoria incluyen secuencias de nucleótidos que se replican autónomamente así como secuencias de nucleótidos que integran el genoma.

La expresión "anfitrión eucariótico" significará cualquier célula u organismo eucariótico, que se puede cultivar para

expresar un PDI o un metabolito de la célula anfitriona. Se entiende bien que la expresión no incluye a los seres humanos.

La expresión "fase G2+M del ciclo celular " también denominada fase G2/M o cambio G2/M significará la fase de ciclo celular corto después de la fase de síntesis (S), donde las células llevan al menos un doble conjunto de cromosomas y están preparadas para división y procesadas para la mitosis (M). La fase G2+M es seguida por una fase caracterizada por el conjunto único de cromosomas.

El término "polipéptido" se refiere a una proteína o péptido que contiene dos o más aminoácidos, normalmente al menos

3, preferiblemente al menos 20, más preferido al menos 30, más preferido al menos 50 aminoácidos. El término también se refiere a polipéptidos de mayor peso molecular, tales como proteínas. En lo sucesivo, los términos "polipéptido" y "proteína" se emplean indistintamente.

La expresión "polipéptido de interés" o PDI como se emplea en la presente memoria se refiere a un bioproducto producido en una célula anfitriona. Más específicamente, se produce un polipéptido, que no es de origen natural en la célula anfitriona, p. ej. una proteína heteróloga. Otros polipéptidos pueden ser naturales para la célula anfitriona, p. ej. proteínas homólogas, pero se producen, por ejemplo, por transformación con un vector autorreplicante que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el PDI, o tras la integración mediante técnicas de ingeniería genética de una o más copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica el PDI en el genoma de la célula anfitriona, o mediante modificación biotecnológica de una o más secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen que codifica el PDI, p. ej. de la secuencia activadora. En algunos casos, el término PDI como se emplea en la presente memoria también se refiere a cualquier metabolito producido por la célula anfitriona mediado por una proteína expresada por biotecnología.

La expresión "célula anfitriona comodín" significará una célula anfitriona, que se prepara mediante ingeniería genética para comprender genes reguladores, tales como los que codifican moduladores del ciclo celular, y que están listos para incorporar un gen de interés (GDI). La línea celular comodín es, por lo tanto, una línea celular anfitriona preformada, que se caracteriza por su capacidad de expresión de cualquier PDI deseado. Esto sigue una estrategia innovadora de "comodín" para la generación de líneas celulares productoras, también llamada línea celular anfitriona de expresión, para la producción de biofármacos, p. ej. utilizando intercambio de casetes mediado por recombinasas específicas del sitio o recombinación homóloga. Dicha nueva célula anfitriona facilita la clonación de un GDI, p. ej. en puntos calientes de expresión genómica predeterminada en cuestión de días para obtener líneas celulares de producción reproducibles y muy eficientes.

Mientras se determinaba la relación de  $q_p$ ,  $\mu$ , y otras propiedades celulares de la levadura *Pichia pastoris*, se descubrió sorprendentemente que  $q_p$  se refiere también a la distribución del ciclo celular de las células anfitrionas (Figura 2). Resultó que un cultivo es más productivo, cuando más células están en la fase G2+M del ciclo celular. A partir de estos datos inesperados, se concluyó que se pueden conseguir mejores propiedades celulares, si las células se diseñan de manera que la distribución de las fases del ciclo celular se cambia a baja  $\mu$ , de modo que hay más células en la fase G2+M del ciclo celular en comparación con el tipo natural.

Como se describe en la presente memoria, se han conseguido por lo tanto células anfitrionas que muestran alta  $q_p$  a baja  $m$ , prolongando así la fase de producción de un cultivo celular que produce un PDI.

Por el método descrito en la presente memoria ambos parámetros,  $q_p$  y la concentración del producto, se aumentan preferiblemente en al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferido al menos 50%.

La alta productividad conseguida como se describe en la presente memoria se caracteriza específicamente por una relación  $q_p / \mu$  que es al menos 3  $\mu\text{g}$  de producto / g de biomasa seca.

El rendimiento volumétrico obtenido preferiblemente está comprendido en el intervalo de 0,01 a 10  $\text{mg}/(\text{l}\cdot\text{h})$ , preferiblemente por encima de 1  $\text{mg}/(\text{l}\cdot\text{h})$ .

Como se describe en la presente memoria, mutantes celulares con mecanismos de control del ciclo celular modificados, manteniendo las células en la fase G2+M del ciclo celular en un estado estacionario durante un período prolongado se han preparado y se ha demostrado que consiguen un mayor productividad general y mayores concentraciones de producto en comparación con el tipo natural.

Mediante la prolongación efectiva de la fase relativamente corta del ciclo celular G2+M, se obtiene preferiblemente un alto porcentaje de células G2+M en el cultivo de células anfitrionas. El contenido preferido de células en fase G2+M conseguido en una línea celular de producción utilizada en un proceso industrial como se describe en la presente memoria, son al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferido al menos el 70%, incluso más preferido al menos el 80% hasta el 90%.

Se alcanzaría el estado estacionario de la fase de producción, si la parte deseada de las células G2+M en el cultivo celular se mantiene durante un período prolongado. Preferiblemente, el estado estacionario se mantiene durante la

mayor parte del tiempo de alimentación, preferiblemente al menos el 50% del tiempo de alimentación, más preferido al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el %. Normalmente, el estado estacionario se mantendría durante un tiempo de proceso de al menos 10 h, preferiblemente al menos 15 h, más preferido al menos 20 h en un proceso alimentado en continuo, que refleja la fase de producción del cultivo celular. En un proceso continuo, el tiempo del proceso podría incluso ser más prolongado.

Normalmente, el estado del ciclo celular para poblaciones celulares puede determinarse por citometría de flujo usando tintes fluorescentes que tiñen el contenido de ADN de los núcleos celulares. La citometría de flujo también es muy adecuada para examinar la distribución general del ciclo celular de células en una población. Mediante la información cuantitativa sobre el contenido de ADN de las células, se puede determinar el número relativo de células en las fases G1, S y G2+M del ciclo celular. Dado que el contenido de ADN de los núcleos celulares varía en todo el ciclo celular de una manera razonablemente predecible, es posible controlar la distribución relativa de las células entre diferentes fases del ciclo celular. La técnica generalmente no determinaría con precisión la posición del ciclo celular de ninguna célula debido a la ambigüedad al asignar células a las fases G2 o M. Por lo tanto, se proporciona la suma de la distribución celular en la fase G2+M.

El objetivo de la ingeniería genética preferiblemente es un regulador del ciclo celular, que puede sobreexpresarse, activarse, mutarse, modularse a un bajo nivel, degradarse o inhibirse específicamente. La sobreexpresión se consigue, por ejemplo, expresando copias adicionales de un regulador del ciclo celular mediante el empleo de un casete de expresión de alta producción o introduciendo más genes que codifican el regulador del ciclo celular. La activación de cinasas mediante fosforilación está apoyada p. ej. por los respectivos factores y cofactores de fosforilación. Los reguladores del ciclo celular también pueden modificarse para proporcionar mutantes resistentes a la degradación. Los medios ejemplares para modular a un bajo nivel reguladores de ciclo celular están empleando silenciamiento de los genes respectivos usando ARNs, ARN complementario o microARN. Los reguladores del ciclo celular también pueden degradarse o inhibirse al aumentar la concentración o actividad de enzima o inhibidor respectiva, p. ej. al modular la actividad de proteasas o cinasas específicas.

Según una realización específica, se puede usar una célula anfitriona transgénica, que tiene una alteración de un gen que codifica el modulador del ciclo celular, para modular a un bajo nivel o eliminar su expresión. Se puede producir una célula anfitriona transgénica por un método para destruir, parcial o completamente, el gen respectivo. En aquellos casos en los que la función o la expresión génica es modulada a un bajo nivel o eliminada, la célula u organismo resultante también puede denominarse transgénico. Una realización del método de producción de células y organismos destruibles comprende la introducción en una célula u organismo en el que un gen debe ser destruido, el ARN que se dirige al gen o a sus secuencias reguladoras y que mantiene la célula u organismo resultante en condiciones bajo las cuales se produce ARN complementario, dando como resultado la degradación o inactivación del ARNm respectivo o sus secuencias reguladoras, produciendo de este modo células u organismos destruidos.

En otra realización, las células u organismos destruidos se producen por eliminación de genes, o intercambio de activadores, o mediante la creación de mutantes sensibles a la temperatura.

Para diseñar una célula anfitriona que exprese un modulador de ciclo celular, un casete de expresión puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula anfitriona. Los vectores de expresión adecuados que comprenden uno o más de los moduladores del ciclo celular pueden construirse y su efecto sobre la distribución de fase G2+M puede determinarse por medios adecuados.

El rendimiento obtenido de un PDI coexpresado se puede comparar con el tipo natural para determinar el efecto del modulador en la expresión de PDI. Una descripción detallada del método experimental se puede encontrar en los ejemplos más adelante.

Preferiblemente, los casetes de expresión que expresan un modulador del ciclo celular podrían integrarse de forma estable en el genoma de la célula anfitriona para preparar la línea celular anfitriona descrita en la presente memoria.

Según una realización preferida, la sobreexpresión del regulador Clb2 del ciclo celular o de otros reguladores del ciclo celular, tales como ciclinas G2/ mitóticas específicas adicionales, cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), y sus factores reguladores, tales como Clb2, Clb1, Clb3-6, Cdc14, Cdc20, Cdc28, Mad2, Pds1, Rrp42, Whi2, se consigue introduciendo un gen que codifica dicho regulador del ciclo celular, aumentando de este modo el número de copias y la respectiva actividad. De este modo, las células realmente han demostrado una mayor  $q_p$  a baja  $\mu$  en comparación con el tipo natural.

Al coexpresar un modulador de ciclo celular adecuado y un PDI, es posible proporcionar, en condiciones comparables, al menos iguales, o al menos aproximadamente 1,3 veces, o al menos aproximadamente 2 veces, o al menos aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, hasta 10 veces de rendimiento en relación con el tipo natural.

Se puede preparar una línea celular comodín diseñando la célula anfitriona para producir el modulador de ciclo celular respectivo como primer paso. A continuación la línea celular comodín puede cambiarse por una línea celular de producción, que está diseñada para expresar un PDI.

Alternativamente, la célula anfitriona puede recombinarse con genes que codifican el modulador del ciclo celular y otros genes de interés al mismo tiempo.

Además, la célula anfitriona también se puede diseñar en primer lugar para expresar un PDI, y luego recombinarse con genes que codifican un modulador de ciclo celular.

El PDI puede ser cualquier polipéptido eucariota, procariota o sintético. Puede ser una proteína segregada de forma natural o una proteína intracelular, es decir, una proteína que no se segrega de forma natural. En la presente memoria se proporciona la producción biotecnológica de homólogos funcionales, variantes funcionales equivalentes, derivados y fragmentos biológicamente activos de proteínas naturales. Los homólogos funcionales son preferiblemente idénticos o corresponden a las características funcionales de una secuencia y tienen las mismas.

Un PDI al que se hace referencia en la presente memoria puede ser, pero no se limita a, una proteína adecuada como sustancia biofarmacéutica como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, factor de crecimiento, hormona, enzima, vacuna o una proteína que puede usarse para aplicación industrial como, p. ej., una enzima. Un PDI preferido se selecciona del grupo de proteínas séricas humanas, tal como una inmunoglobulina o albúmina sérica, enzimas, hormonas, moléculas señalizadoras, proteínas de la matriz, fragmentos o uno de sus derivados, o un polipéptido que media la producción de un metabolito de la célula anfitriona. El PDI es preferiblemente un polipéptido o proteína recombinante heterólogo, que se puede producir ventajosamente en una célula eucariota, preferiblemente una célula de levadura, preferiblemente como proteínas segregadas. Ejemplos de proteínas producidas preferiblemente son inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulinas, aprotinina, inhibidor de la vía del factor hístico u otros inhibidores de proteasas, e insulina o precursores de insulina, análogos de insulina, hormonas de crecimiento, interleucinas, activador del plasminógeno hístico, factor a o b de crecimiento transformante, glucagón, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), péptido 2 similar al glucagón (GLP-2), GRPP, factor VII, factor VIII, factor XIII, derivado de plaquetas factor 1 de crecimiento derivado de plaquetas, albúmina sérica, enzimas, tales como lipasas o proteasas, o un análogo funcional de cualquiera de estas proteínas. En el presente contexto, la expresión "análogo funcional" significa un polipéptido con una función similar a la de la proteína natural. El polipéptido puede ser estructuralmente similar a la proteína natural y puede proceder de la proteína natural por adición de uno o más aminoácidos a uno o ambos extremos terminales C y N o a la cadena lateral de la proteína natural, la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o varios sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos naturales, la eliminación de uno o más aminoácidos en uno o en ambos extremos de la proteína natural o en uno o varios sitios en la secuencia de aminoácidos, o la inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos naturales. Dichas modificaciones son bien conocidas para varias de las proteínas mencionadas anteriormente.

El PDI recombinante se produce normalmente por técnicas de ingeniería genética a través de una línea celular de producción biotecnológica, que comprende un gen recombinado de interés que codifica dicho PDI. Se entiende específicamente que dicho PDI producido según los métodos descritos no es un modulador del ciclo celular o regulador del ciclo celular, sino que se produce opcionalmente como producto recombinante además de cualquier modulador de ciclo celular recombinante producido por el mismo cultivo celular, como puede ser el caso.

Un PDI también se puede seleccionar de sustratos, enzimas, inhibidores o cofactores que proporcionan reacciones bioquímicas en la célula anfitriona, con el objetivo de obtener el producto de dicha reacción bioquímica o una cascada de varias reacciones, p.ej. para obtener un metabolito de la célula anfitriona. Los productos ejemplares pueden ser vitaminas, como riboflavina, ácidos orgánicos y alcoholes o antibióticos, que se pueden obtener con mayores rendimientos después de la expresión de una proteína recombinante o un PDI como se describe en la presente memoria.

En general, la célula anfitriona, que expresa un producto recombinante, puede ser cualquier célula fúngica adecuada para expresión biotecnológica de un PDI.

Los ejemplos de células de levadura preferidas utilizadas como células anfitrionas descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan al género *Saccharomyces* (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*), el género *Pichia* (p. ej., *P. pastoris* o *P. methanolica*), el género *Komagataella* (*K. pastoris*, *K. pseudopastoris* o *K. phaffii*), *Hansenula polymorpha* o *Kluyveromyces lactis*. La bibliografía más reciente divide y renombra a *Pichia pastoris* en *Komagataella pastoris*, *Komagataella phaffii* y *Komagataella pseudopastoris*. En la presente memoria *Pichia pastoris* se emplea como sinónimo para todas, *Komagataella pastoris*, *Komagataella phaffii* y *Komagataella pseudopastoris*.

El organismo productor de levadura preferiblemente usado en la presente memoria puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que, en el cultivo, produce grandes cantidades de la proteína o polipéptido heterólogo en cuestión. Ejemplos preferidos organismos de levadura adecuados son cepas seleccionadas de las especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida* sp., *Candida utilis*, *Candida cacaio*, *Geotrichum* sp., y *Geotrichum fermentans*.

Las células anfitrionas de levadura más preferidas proceden de levadura metilótrofa, tal como de *Pichia* o *Komagataella*, p.ej. *Pichia pastoris*, *Komagataella pastoris*, *K. phaffii* o *K. pseudopastoris*. Ejemplos de anfitriones incluyen levaduras como *P. pastoris*. Ejemplos de cepas de *P. pastoris* incluyen CBS 704 (= NRRL Y-1603 = DSMZ 70382), CBS 2612 (= NRRL Y-7556), CBS 7435 (= NRRL Y-11430), CBS 9173-9189 y DSMZ 70877 (Colección alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), pero también cepas de Invitrogen, tales como X-33, GS115, KM71 y SMD1168. Ejemplos de cepas de *S. cerevisiae* incluyen W303, CEN.PK y la serie BY (colección

EUROSCARF). Todas las cepas descritas anteriormente se han utilizado con éxito para producir transformantes y expresar genes heterólogos.

En general, las proteínas de interés a las que se hace referencia en la presente memoria pueden producirse por métodos de expresión biotecnológica bien conocidos por un experto en la técnica. Según los métodos, líneas celulares y cultivos celulares descritos en la presente memoria pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ingeniería genética dentro de la habilidad en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982).

Las secuencias de nucleótidos que podrían utilizarse para diseñar la célula anfitriona tal como se utiliza en la presente memoria, que proporcionarían una producción de proteína recombinada mejorada, pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes. El origen de un activador es preferiblemente a partir de una célula de levadura, más preferiblemente de levadura metilotrófica tal como del género *Pichia*. El origen preferido del homólogo de la secuencia de nucleótidos facilita su incorporación en la célula anfitriona del mismo género, permitiendo por lo tanto la producción estable de un PDI, posiblemente con mayores rendimientos en los procesos de fabricación industrial. También se pueden usar secuencias de nucleótidos equivalentes funcionalmente heterólogas de otros anfitriones adecuados.

Los vectores de expresión apropiados comprenden secuencias reguladoras adecuadas para la expresión de ADN que codifica un polipéptido heterólogo o proteína en una célula anfitriona eucariota. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen activadores, operadores y potenciadores, puntos de unión ribosómica y secuencias que controlan la iniciación de la transcripción y traducción y la terminación. Las secuencias reguladoras pueden estar operativamente unidas a la secuencia de ADN que se va a expresar. Por ejemplo, se dice que una secuencia activadora está operativamente unida a una secuencia codificante, si el activador controla la transcripción de la secuencia de codificación.

En la presente memoria se proporciona un anfitrión de *P. pastoris* que comprende secuencias reguladoras ligadas operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el modulador del ciclo celular y la secuencia de nucleótidos que codifica el PDI, opcionalmente empleando además secuencias reguladoras unidas operativamente a la misma.

Según una realización preferida, el método descrito en la presente memoria emplea una secuencia de nucleótidos recombinada que codifica el PDI, que se proporciona en un plásmido adecuado para la integración en el genoma de la célula anfitriona, en una única copia o en múltiples copias por célula. La secuencia de nucleótidos recombinada que codifica el PDI también se puede proporcionar en un plásmido de replicación autónoma en una sola copia o en múltiples copias por célula.

El método preferido descrito en la presente memoria emplea un plásmido, que es un vector de expresión eucariota, preferiblemente un vector de expresión de levadura. Los vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a vectores de clonación, vectores de clonación modificados y plásmidos diseñados específicamente. El vector de expresión preferido como se emplea en la presente memoria puede ser cualquier vector de expresión adecuado para la expresión de un gen recombinado en una célula anfitriona y se selecciona dependiendo del organismo anfitrión. El vector de expresión biotecnológica puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse o integrarse en el genoma de los organismos hospedadores, también llamados vectores hospedadores, tal como un vector de levadura. Un vector de expresión de levadura preferido es para la expresión en levaduras seleccionadas del grupo que consiste en levaduras metilótroficas representadas por los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*.

Se prefiere usar plásmidos derivados de pPICZ, pGAPZ, pPIC9, pPICZalfa, pGAPZalfa, pPIC9K, pGAPHis o pPUZZLE como vector en los métodos, líneas celulares y cultivos celulares descritos en la presente memoria.

Para permitir la expresión de una secuencia de nucleótidos recombinante en una célula anfitriona, el vector de expresión puede proporcionar la secuencia de nucleótidos recombinada con un activador funcional adyacente al extremo 5' de la secuencia de codificación, p. ej. aguas arriba del gen del péptido señal. La transcripción de este modo es regulada e iniciada por esta secuencia activadora.

El activador puede ser cualquier secuencia de ADN adecuada que muestra actividad de transcripción en la célula anfitriona y puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas al anfitrión. El activador procede preferiblemente de un gen que codifica una proteína homóloga a la célula anfitriona. El activador puede ser un activador endógeno o heterólogo a la célula anfitriona.

Las secuencias activadoras adecuadas para uso con células anfitrionas de mamífero pueden incluir, pero no se limitan a activadores obtenidos de los genomas de virus, activadores heterólogos de mamífero, p. ej. el activador de actina o un activador de inmunoglobulina y activadores de la proteína de choque térmico. El activador no se limita a ninguna especie en particular, siempre que pueda funcionar en células anfitrionas eucariotas y en especial en levadura.

Otras secuencias activadoras adecuadas para uso con células anfitrionas de levadura pueden incluir, pero no se

limitan a, activadores obtenidos a partir de genes que codifican enzimas metabólicas que se sabe que están presentes a alta concentración en la célula, p.ej. enzimas glucolíticas como triosafosfato isomerasa (TPI), fosfoglicerato cinasa (PGK), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), alcohol oxidasa (AOX), lactasa (LAC) y galactosidasa (GAL).

- 5 Los ejemplos preferidos de activadores adecuados son los activadores de levaduras, que contienen una secuencia de ADN que funciona como un activador para la transcripción de genes en células de levadura. Los ejemplos preferidos son los activadores Mal, TPI, CUP, ADH o PGK de *S. cerevisiae*, o el activador de la glucosa-6-fosfato isomerasa (PPGI) de *P. pastoris*, el activador de la 3-fosfoglicerato cinasa (PPGK) o el activador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa PGAP, el activador de alcohol oxidasa (PAOX), el activador de formaldehído deshidrogenasa (PFLD), el activador de isocitrato liasa (PICL), el activador del factor de elongación de la traducción (PTEF), y los activadores de *P. pastoris* enolasa 1 (PENO1), triosa fosfato isomerasa (PTPI), alfa-cetoisocaproato descarboxilasa (PTHI), las proteínas de la subunidad ribosómica (PRPS2, PRPS7, PRPS31, PRPL1), miembros de la familia de proteínas del choque térmico (PSSA1, PHSP90, PKAR2), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGND1), fosfoglicerato mutasa (PGPM1), transcetolasa (PTKL1), fosfatidilinositol sintasa (PPIS1), ferro-O<sub>2</sub>-oxidoreductasa (PFET3), permeasa de hierro de alta afinidad (PFTR1), fosfatasa alcalina reprimible (PPHO8), N-miristoil transferasa (PNMT1), factor de transcripción de la respuesta a feromonas (PMCM1), ubiquitina (PUB14), endonucleasa de ADN monocatenario (PRAD2) y el activador del portador principal de ADP/ATP de la membrana mitocondrial interna (PPET9).

En un sistema de expresión preferido, el activador es un activador inducible o constitutivo.

- 20 Según una realización preferida, se obtiene un montaje recombinado ligando los genes relevantes en un vector. Estos genes pueden integrarse de forma estable en el genoma de la célula anfitriona mediante la transformación de la célula anfitriona utilizando dichos vectores. Los polipéptidos codificados por los genes pueden producirse usando la línea celular anfitriona recombinante cultivando un transformante, obtenido de este modo en un medio apropiado, aislando el PDI expresado del cultivo, y purificándolo por un método apropiado para el producto expresado, en particular para separar el PDI de las proteínas contaminantes.

Los métodos utilizados para ligar las secuencias de ADN, p. ej. codificando el modulador del ciclo celular y/o el PDI, el activador y el terminador, respectivamente, e insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la integración o la replicación del anfitrión, son bien conocidos por los expertos en la técnica, p. ej. descritos por J. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning 2nd ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

- 30 Se entenderá que uno o más vectores, que usan los genes que codifican el modulador del ciclo celular y/o el PDI como objetivo de integración, se puede construir ya sea preparando en primer lugar los montajes de ADN que contienen toda la secuencia de ADN que codifica el modulador y/o el PDI y que inserta posteriormente los montajes en uno o más vectores de expresión adecuados, o insertando sucesivamente fragmentos de ADN que contienen información genética para los genes seguido de ligadura.
- 35 También se pueden usar vectores de multiclonación, que son vectores que tienen un sitio de multiclonación, en los métodos, líneas celulares y cultivos celulares descritos en la presente memoria, en donde se puede incorporar un gen deseado en un sitio de multiclonación para proporcionar un vector de expresión. En los vectores de expresión, el activador se coloca aguas arriba del gen del PDI y regula la expresión del gen. En el caso de los vectores de multiclonación, porque el gen del PDI se introduce en el sitio de multiclonación, el activador se coloca aguas arriba del sitio de multiclonación.

- Se prefieren varios métodos diferentes para la expresión y secreción del PDI en la célula anfitriona eucariota. Las proteínas se expresan, procesan y segregan transformando el organismo eucariótico con un vector de expresión que alberga ADN que codifica la proteína deseada y al menos uno de los elementos reguladores como se describe en la presente memoria, preparando un cultivo del organismo transformado, cultivando el cultivo y recuperando la proteína del medio de cultivo. El péptido señal empleado puede ser el péptido señal descrito en la presente memoria o uno alternativo, p. ej. un péptido señal heterólogo o un híbrido de un péptido señal natural y uno heterólogo. La función del péptido señal es permitir que la proteína heteróloga se segregue para entrar en el retículo endoplasmático. El péptido señal normalmente se escinde durante este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo anfitrión que produce la proteína.

- 50 El montaje de ADN proporcionado para obtener una célula anfitriona biotecnológica como se describe en la presente memoria puede prepararse por síntesis por métodos normalizados conocidos, p. ej. el método de fosforamida. El montaje de ADN también puede ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, obtenido preparando una genoteca o biblioteca de ADNc y detectando secuencias de ADN que codifican todo o parte del PDI por hibridación usando sondas oligonucleotídicas sintéticas según técnicas normalizadas. Por último, el montaje de ADN puede ser de origen sintético y genómico mixto, sintético y ADNc mixto o genómico y ADNc mixto preparado por hibridación de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc, según corresponda, correspondiendo los fragmentos a varias partes del montaje de ADN completo, según técnicas normalizadas.

Los transformantes descritos en la presente memoria pueden obtenerse introduciendo dicho vector de ADN, p. ej.

ADN plásmido, en un anfitrión y seleccionando transformantes que expresan el PDI o el metabolito de la célula anfitriona con altos rendimientos. Se tratan células anfitrionas para permitirles que incorporen ADN extraño por métodos usados convencionalmente para la transformación de células eucariotas, tales como el método de impulso eléctrico, el método de protoplastos, el método de acetato de litio y métodos modificados de los mismos. *P. Pastoris* se transforma preferiblemente por electroporación.

En otra realización preferida, el vector de expresión de levadura es capaz de integrarse de forma estable en el genoma de levadura, p. ej. por recombinación homóloga.

Se entiende que los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir además cultivar dichas células anfitrionas biotecnológicas en condiciones que permitan la expresión del PDI, preferiblemente en la forma segregada. Un PDI segregado, producida de manera recombinante o un metabolito de la célula anfitriona puede aislarse a continuación del medio de cultivo celular u otras fracciones de cultivo celular y purificarse más por técnicas bien conocidas por un experto en la técnica.

Un método preferido descrito en la presente memoria se refiere al aumento del rendimiento de una producción de PDI recombinado en un cultivo celular, que comprende

15 a) diseñar genéticamente una línea celular de producción de eucariotas para dar lugar específicamente a la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular,

b) cultivar dicha línea celular de producción, y

c) recoger una fracción del cultivo celular que contiene el PDI.

Las técnicas de cultivo adecuadas pueden abarcar el cultivo en un biorreactor que comienza con una fase discontinua, seguido de una breve fase exponencial de alimentación discontinua a una tasa de crecimiento específico alta, seguido además de una fase de alimentación discontinua a baja tasa de crecimiento específico. Otra técnica de cultivo adecuada puede abarcar una fase discontinua seguida de una fase de cultivo continuo a una baja tasa de dilución. Las técnicas de fermentación preferidas son cultivo discontinuo, de alimentación discontinuo o cultivo continuo.

25 Las condiciones de producción a escala industrial se refieren a, p. ej. cultivo discontinuo alimentado en volúmenes de reactor de 100 l a 10 m<sup>3</sup> o mayor, empleando tiempos de proceso típicos de varios días, o procesos continuos en volúmenes de fermentador de aprox. 50 – 1.000 l o mayor, con tasas de dilución de aprox. 0,05 – 0,15 h<sup>-1</sup>.

El cultivo de células muy productoras descrito en la presente memoria también puede obtenerse sin la influencia de un modulador recombinante del ciclo celular, p. ej. mediante técnicas de cultivo específicas que prolongarían la fase G2+M. Entre éstas están condiciones controladas de temperatura, como temperaturas por debajo de la temperatura óptima de crecimiento, o de alimentación del sustrato, como el control intermitente de la alimentación o la pulsación de sustratos o productos químicos u otras. De este modo, el cultivo celular podría mantenerse en la distribución G2+M deseada en el estado estacionario según convenga para soportar la alta productividad del cultivo celular.

Una célula anfitriona transformante descrita en la presente memoria obtenida transformando la célula con un gen que codifica un modulador del ciclo celular y/o los genes del PDI pueden cultivarse preferiblemente en primer lugar en condiciones para crecer eficientemente en un gran número de células grandes sin la carga de expresar una proteína heteróloga. Cuando se prepara la línea celular para la expresión de PDI y el cultivo celular ha alcanzado una densidad celular normalmente de 10 g/l de peso celular seco, se seleccionan las técnicas de cultivo para producir el producto de expresión.

40 Se prefiere cultivar la línea de células anfitrionas descrita en la presente memoria en un biorreactor en condiciones de crecimiento para obtener una densidad celular de al menos 1 g/l de peso celular seco, más preferiblemente al menos 10 g/l de peso celular seco, preferiblemente menos de 50 g/l de peso celular seco, pero menos de 150 o menos de 200, preferiblemente menos de 100.

45 Cuando el transformante se cultiva con un estímulo inductivo, se puede activar un modulador del ciclo celular para conseguir el estado estacionario G2+M, y se expresa el PDI. Un estímulo inductivo es preferiblemente calor, o adición de cadmio, cobre, un agente que aumenta la presión osmótica, peróxido de hidrógeno, etanol, metanol, metilamina o similares. Alternativamente, la expresión génica puede estimularse por desrepresión, p. ej. por eliminación o dilución de glucosa o tiamina, o similares.

50 Preferiblemente la levadura se cultiva en un medio mineral con una fuente de carbono adecuada, lo que simplifica aún más el proceso de aislamiento de manera significativa. Un ejemplo de un medio mineral preferido es el que contiene una fuente de carbono utilizable (p. ej., glucosa, glicerol o metanol), sales que contienen los macroelementos (potasio, magnesio, calcio, amonio, cloruro, sulfato, fosfato) y oligoelementos (cobre, yoduro, manganeso, molibdato, cobalto, zinc, y sales de hierro, y ácido bórico), y opcionalmente vitaminas o aminoácidos, p. ej. para complementar auxotrofías.

Es ventajoso proporcionar la producción de PDI a escala piloto o industrial. La escala del proceso industrial preferiblemente emplearía un volumen de al menos 50 l, preferiblemente al menos 1 m<sup>3</sup>, preferiblemente al menos 10 m<sup>3</sup>, aún más preferiblemente al menos 100 m<sup>3</sup>.

5 El PDI se expresa preferiblemente empleando condiciones para producir rendimientos de al menos 1 mg/l, preferiblemente al menos 10 mg/l, preferiblemente al menos 100 mg/l, lo más preferido al menos 1 g/l.

La célula anfitriona descrita en la presente memoria se prueba preferiblemente para determinar su capacidad de expresión o rendimiento mediante al menos una de las siguientes pruebas: ELISA, ensayo de actividad, HPLC u otras pruebas adecuadas.

10 Las células transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para efectuar la expresión del PDI deseado, que puede purificarse a partir de las células o del medio de cultivo, dependiendo de la naturaleza del sistema de expresión y la proteína expresada, p. ej. si la proteína está fusionada a un péptido señal y si la proteína es soluble o está unida a la membrana. Como entenderá el experto en la técnica las condiciones de cultivo variarán según los factores que incluyen el tipo de célula anfitriona y vector de expresión particular empleado.

15 Se prefiere que las fracciones específicas del cultivo celular se recojan para obtener el PDI como bioproducto. Normalmente el sobrenadante del cultivo celular se recogería, p. ej. para obtener un PDI segregado. Dependiendo de las características de PDI, puede recuperarse a partir de fracciones intracelulares o desechos celulares. Por ejemplo, las células transformadas cultivadas pueden romperse mediante ultrasonidos o mecánicamente, enzimática o químicamente para obtener un extracto celular que contenga el PDI deseado, a partir del cual se aísla y purifica el PDI. La secreción de los productos de expresión recombinados a partir de las células de levadura generalmente es ventajosa por razones que incluyen facilitar el proceso de purificación, ya que los productos pueden recuperarse del sobrenadante del cultivo en lugar de la mezcla compleja de proteínas que resulta cuando las células de levadura se rompen para liberar proteínas intracelulares.

El compuesto deseado normalmente puede aislarse y purificarse usando los últimos adelantos de la técnica.

25 Como métodos de aislamiento y purificación para obtener un polipéptido o producto de proteína recombinante, se puede usar métodos, tales como los métodos que utilizan la diferencia en la solubilidad, como el salado y la precipitación con disolvente, métodos que utilizan la diferencia en peso molecular, como la ultrafiltración y la electroforesis en gel, métodos que utilizan la diferencia en la carga eléctrica, tales como cromatografía de intercambio iónico, métodos que utilizan afinidad específica, tales como cromatografía de afinidad, métodos que utilizan diferencia en hidrofobicidad, como la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, y métodos que utilizan la diferencia en el punto isoeléctrico, tal como el enfoque isoeléctrico. Se emplean preferiblemente etapas de purificación específicas para separar cualquier modulador de ciclo celular que se coexpresa y contaminaría la preparación del PDI.

30 El producto muy purificado está esencialmente exento de proteínas contaminantes, y preferiblemente tiene una pureza de al menos el 90%, más preferido al menos el 95%, o incluso al menos el 98%, hasta el 100%. Los productos purificados pueden obtenerse por purificación del sobrenadante del cultivo celular o también de restos celulares.

40 El PDI aislado y purificado se puede identificar por métodos convencionales tales como transferencia Western o ensayo de su actividad. La estructura del compuesto purificado puede definirse por análisis de aminoácidos, análisis del amino terminal, análisis de la estructura primaria, y similares. Se prefiere que el compuesto se obtenga en grandes cantidades y con una alta pureza, cumpliendo así los requisitos necesarios para ser utilizado como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

45 La línea celular anfitriona preferida descrita en la presente memoria mantiene las propiedades genéticas empleadas en la presente memoria, y el nivel de expresión sigue siendo alto, p. ej. al menos a nivel de µg, incluso después de aproximadamente 20 generaciones de cultivo, preferiblemente al menos 30 generaciones, más preferiblemente al menos 40 generaciones, lo más preferido de al menos 50 generaciones. La célula anfitriona biotecnológica es sorprendentemente estable, lo que es una gran ventaja cuando se usa para la producción de proteínas a escala industrial.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que de ninguna manera están destinados

50 a limitar el alcance de la invención reivindicada.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Distribución del ciclo celular a tasas de crecimiento específicas

Para analizar las células de *P. pastoris* a diferentes tasas de crecimiento específicas, se cultivaron en cultivos de quimiostato en un intervalo de tasas de dilución entre 0,01 h<sup>-1</sup> y 0,21 h<sup>-1</sup>. El cultivo en quimiostato se inició y los

cultivos por lotes habían llegado a su fin. Cada tasa de dilución se mantuvo durante al menos cinco tiempos de residencia, antes de que se tomaran muestras para determinar el peso seco de la biomasa, concentración de fragmentos Fab y distribución del ciclo celular.

- 5 Medio GLU01 de quimiostato: 1,0 g de ácido cítrico monohidratado, 55 g de glucosa monohidratada, 4,4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,7 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,7 g de KCl, 0,01 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 ml de solución Trace Metal (PTM1) y 1,0 ml de solución de biotina ( $0,2 \text{ g l}^{-1}$ ) se disolvieron por 1.000 ml de ddH<sub>2</sub>O, seguido de filtración estéril.

- 10 La concentración de biomasa seca se determinó lavando y secando la biomasa de alícuotas de 10 ml del cultivo. La concentración del fragmento Fab se determinó por ELISA según lo descrito por Dragosits *et al.* 2009 (*J. Proteome Res.* marzo 2009; 8(3):1380-92). La productividad específica se calculó dividiendo la concentración de Fab entre la concentración de biomasa seca y multiplicando por la tasa de dilución.

- 15 Para el análisis de distribución de fase del ciclo celular, se lavaron muestras de células fijadas con etanol de cada punto de muestra y se trataron con RNasa A. Luego las células se sonicaron y se incubaron en una solución de yoduro de propidio para permitir al reactivo entrar en las células y teñir el ADN genómico. La citometría de flujo permite medir varios miles de células. Se usó un recuento de 50,000 como la cantidad normal. En caso de una concentración celular muy baja en la muestra restante, este umbral tuvo que ser reducido. Los datos se evaluaron con la ayuda del FCS Express Software. El porcentaje de células que está en fase G2+M del ciclo celular se calculó de la siguiente manera:  $(\% \text{ de células G2+M}) / [(\% \text{ de células G1}) + (\% \text{ de células G2+M})]$ . Como resultado, el porcentaje de células que se encuentran en la fase G1 es de  $100 - (\% \text{ de células G2+M})$ . Este cálculo omite todas las celdas que no fueron asignadas a la fase G1 ni a la G2+M.

- 20 La productividad específica  $q_p$  y la distribución de fase del ciclo celular a diferentes tasas de crecimiento específico se muestran en la figura 3.

Ejemplo 2. Sobreexpresión de CLB2 en *P. pastoris* y determinación de la distribución del ciclo celular a tasas de crecimiento específico

a) Construcción de plásmidos de co-sobreexpresión

- 25 Para generar un plásmido adecuado para co-sobreexpresión del gen CLB2 de *P. pastoris* en una cepa que ya expresa una proteína heteróloga, el gen CLB2 se amplificó por PCR de la genoteca de *P. pastoris*. Se añadieron secuencia Kozak de *P. pastoris* codificada sin plantilla y secuencias de restricción para SbfI y SfiI usando los respectivos cebadores oligonucleotídicos directo (5'-GATCCACCTGCAGGCCATGTCTAATGTTTCAGCCTAACGA-3', SEQ ID n° 1) y complementario (5'-TCGGCCGAGGCGGCCCTACAAAATTGGATCCATGATGC-3', SEQ ID n° 2). Los productos de PCR tratados con SbfI y SfiI se clonaron en pPuzzleKanR (SbfI y SfiI digeridos y tratados con fosfatasa alcalina). El nuevo plásmido de co-sobreexpresión pPuzzleKanR-CLB2 se transformó en Top10 de *E. coli* (Invitrogen). La digestión y secuenciación de la endonucleasa de restricción se realizó para verificar la identidad correcta del plásmido construido.

- 35 b) Construcción de cepas de *P. pastoris* que sobreexpresan el fragmento Fab del anticuerpo humano recombinante 3H6 y un nuevo gen del factor cooperador

- 40 Se usó el plásmido pPuzzleKanR-CLB2, obtenido en el método de clonación descrito en el Ejemplo 2, etapa a) para transformar una cepa de *P. pastoris* preseleccionada para la expresión de alto nivel del fragmento Fab de anticuerpo recombinante humano 3H6 bajo el control del activador GAP (Dragosits *et al.*, 2009, *J. Proteome Res.* marzo 2009; 8(3):1380-92). La selección se basó en la resistencia a Zeocin para los genes del fragmento Fab y la resistencia a Geneticina para los genes del factor cooperador.

Para evaluar el efecto del gen regulador del ciclo celular co-sobreexpresado, el fragmento Fab que expresa la cepa se transformó también con un plásmido pPuzzleKanR sin gen regulador del ciclo celular.

Ejemplo 3. Sobreexpresión/eliminación de otros reguladores del ciclo celular para cambiar el ciclo celular

- 45 a) Para la sobreexpresión de otros reguladores del ciclo celular se construyeron vectores de expresión como se describe en el ejemplo 2.a, excepto que los genes reguladores del ciclo celular deseados se amplificaron y clonaron en lugar de CLB2. MAD2 y PDS1 de *S. cerevisiae* y RRP42 de *P. pastoris* se clonaron así en pPuzzleKanR para construir pPuzzleKanR-MAD2, pPuzzleKanR-PDS1 y pPuzzleKanR-RRP42.

Estos plásmidos se transformaron en *P. pastoris* produciendo 3H6 Fab, como se describe en el ejemplo 2.b).

b) Eliminación de los genes reguladores del ciclo celular del genoma de *P. pastoris*

- 50 Dos fragmentos del gen regulador del ciclo celular de aprox. 350 pb de longitud se amplifican por PCR y se clonan en ambos lados del casete marcador kanMX4 lo que confiere resistencia a G418. Después de la transformación de *P. pastoris* y selección para resistencia a G418, la eliminación de parte del gen regulador del ciclo celular se verifica por PCR.

Ejemplo 4. Cultivo de un cultivo celular y análisis del efecto de la sobreexpresión del regulador del ciclo celular

5 Precultivos de la cepa que sobreexpresa CLB2 (como se describe en el ejemplo 2.b) en 2,5 ml de YPD (20 g/l de peptona de soja) (HY QUEST), 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa, pH 7,4) en tubos de 50 ml se inocularon con células en una placa. Al día siguiente, todos los cultivos principales (10 ml de medio sintético del matraz en agitación en tubos de 50 ml) se inocularon con una  $DO_{600}$  de 0,1. Medio de cultivo principal: (22 g de ácido cítrico monohidratado, 22 g de glucosa monohidratada, 3,15 g de  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0,492 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,8040 g de KCl, 0,0268 g de  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 1,47 ml de Trace Metal Solution (PTM1) y 2,0 ml de solución de biotina ( $0,2 g l^{-1}$ ) se disolvieron por 1.000 ml de ddH<sub>2</sub>O. El pH se ajustó a 5 con KOH al 25%, seguido de filtración estéril.

10 Los cultivos principales se iniciaron a una  $DO_{600}$  de 0,1 y se agitaron a 170 rpm a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió después de aproximadamente 24 horas y la final después de 48 horas. Las muestras de sobrenadante para el análisis de proteínas se dibujaron en ambos puntos en el tiempo. La concentración de Fab extracelular, analizada por ELISA, se relacionó con la densidad óptica del cultivo después de 24 y 48 horas de cultivo. Se cultivaron cuatro transformantes por cepa y se compararon con su respectiva cepa de referencia.

Producto promedio por biomasa: cambio de veces de clones CLB2 sobre referencias del vector:

Tiempo	Aumento de cambio de veces
24 h	2,8
48 h	1,2

15

Ejemplo 5: Análisis de contenido de ADN

Se tomaron muestras de células fijadas en etanol durante la fase de crecimiento exponencial después de 24 horas en cultivo en matraz en agitación, y se trataron para la tinción de ADN y el análisis de citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1. La distribución de las fases del ciclo celular se muestra en la tabla a continuación.

20

Cepa	% de células en G1	% de células en G2+M
Peso referencia	40	60
CLB2	16	84

Ejemplo 6. Cultivo en quimiostato

25 El cultivo en quimiostato se inició para el PpCLB2 y la cepa de referencia después de que sus cultivos por lotes habían finalizado. Cada tasa de dilución se mantuvo durante al menos tres tiempos de residencia. Masa seca de levadura, valor de Fab3H6 y productividad específica se resumen en la Tabla 1, y la productividad específica frente a la tasa de crecimiento específico se muestra en la Fig. 3.

Medio en quimiostato GLU01: 1,0 g de ácido cítrico monohidratado, 55 g de glucosa monohidratada, 4,4 g de  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0,7 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1,7 g de KCl, 0,01 g de  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 1,6 ml de Trace Metal Solution (PTM1) y 1,0 ml de solución de biotina ( $0,2 g l^{-1}$ ) se disolvieron por 1.000ml de ddH<sub>2</sub>O, seguido de filtración estéril.

30

Tabla 1: Cultivo en quimiostato a tres tasas de dilución distintas

$\mu = D$ [h <sup>-1</sup> ]	referencia			PpCLB2		
	YDM [g L <sup>-1</sup> ]	Fab 3H6 [μg L <sup>-1</sup> ]	$q_P$ [mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	YDM [g L <sup>-1</sup> ]	Fab 3H6 [μg L <sup>-1</sup> ]	$q_P$ [mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
0,06	26,68	17,27	0,039	26,58	23,346	0,053
0,1	27,25	13,15	0,048	27,47	15,964	0,058
0,15	27,49	12,78	0,07	27,63	12,427	0,067

## Ejemplo 7. Fermentación alimentada de forma discontinua de clones naturales y de sobreexpresión de CLB2

Los datos obtenidos de las muestras de quimiostato se usaron para calcular  $q_P$  en función de  $\mu$  para simular un proceso de producción alimentados por lotes con un máximo teórico de productividad volumétrica  $Q_P$  (Maurer *et al.*, 2006 *Microb. Cell Fact.*). La estrategia de fermentación optimizada consistía en diferentes fases para realizar la cinética de crecimiento calculada. La fase discontinua fue seguida por una fase de alimentación exponencial con una tasa de crecimiento de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  para la producción rápida de biomasa (8 horas o 5 horas, respectivamente) antes de que  $\mu$  se desacelere hasta el final del proceso (8 o 22 horas adicionales, respectivamente). El proceso fue diseñado para alcanzar una biomasa de  $100 \text{ g l}^{-1}$  y optimizado para  $Q_P$ .

En cuanto al cultivo en quimiostato, la alimentación se inició en una hora después del consumo total de sustrato (glicerol) en el lote. El medio discontinuo de alimentación (glucosa) se bombeó al reactor según una función de alimentación calculada que representa la demanda de sustrato para aproximar la curva de crecimiento modelada para la formación óptima del producto.

Se tomaron muestras de cada uno de los dos bioprocesos paralelos cada dos a tres horas concentrándose mucho en simultaneidad en lo relativo a intervalos de tiempo y volúmenes de muestra iguales que no excedieron de 15-20 ml por muestreo, incluida la purga.

Los dos protocolos de lotes alimentados modelados se realizaron dos veces para la cepa PpCLB2 y la cepa de referencia, produciendo cuatro fermentaciones paralelas, ocho fermentaciones en total. Se prestó atención al tratamiento equitativo de los lotes alimentados en paralelo en lo relativo al tiempo transcurrido entre el pico  $pO_2$  y el comienzo de la alimentación, así como el muestreo equidistante y la cantidad de muestra. En el curso de los protocolos optimizados de la cepa de referencia, la aireación resultó ser insuficiente una vez se alcanzó el límite superior del agitador de 1250 rpm. Para evitar una caída del valor de  $pO_2$ , que tenía su punto de ajuste en el 20% y estaba controlado por la actividad del agitador, hasta el 25% de oxígeno puro se añadió al flujo de aire según se necesite. Una vez más, los cultivos paralelos fueron tratados de igual manera con respecto a la aireación.

## Ejemplo 8: Distribución de fase del ciclo celular en muestras de fermentación discontinua alimentadas:

Para medir el tamaño o la viabilidad de las células, las muestras se diluyeron en PBS y se pudieron obtener directamente en el Citómetro de flujo BD FACS Calibur™ y analizar con el programa informático BD CellQuest™.

Las muestras destinadas al análisis del contenido de ADN debían fijarse en etanol al 70%. Mientras que unos pocos ml de cultivo discontinuo alimentado de alta densidad en 500 ml de etanol eran suficientes para el tratamiento adicional de la muestra, hasta 1 ml de cultivo de matraz en agitación de baja densidad se sedimentaron por centrifugación y se volvieron a poner en suspensión añadiendo un volumen igual de etanol enfriado en hielo gota a gota. En todos los casos, las células tuvieron que lavarse dos veces con PBS para eliminar el etanol, se incubaron con RNasa A ( $35 \text{ U ml}^{-1}$ ) durante una hora para digerir dsARN y se lavaron de nuevo dos veces en PBS. La solución con las células se transfirió luego a un tubo FACS y se sometió a ultrasonidos en un arranque durante tres segundos para romper grumos de células antes de mezclarlas con un volumen igual de solución PI (1: 100 en PBS). Después de una breve agitación en remolino, las células estaban listas para ser medidas. Las muestras deberían contener idealmente  $1 \times 10^6$  células o partículas por ml.

Las distribuciones de fase del ciclo celular de la cepa que sobreexpresa CLB2 y la cepa natural se muestran en la figura 4.

**Listado de secuencias**

<110> Universität für Bodenkultur Wien

<120> Línea celular para producción

<130> BK004P

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

gatccacctg caggccatgt ctaatgttca gcctaacga 39

# ES 2 661 788 T3

<210> 2  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> cebador

<400> 2  
tcggccgagg cggcctaca aaattggatc catgatgc 38

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un polipéptido recombinante de interés (PDI) en un cultivo celular, que comprende modificar genéticamente una línea celular fúngica para sobreexpresar un regulador del ciclo celular que origina la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/ mitótica específica, y seguidamente producir el PDI, en donde el PDI es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha línea celular es una línea celular que tiene integrada de forma estable en su genoma un casete de expresión para expresar dicho regulador del ciclo celular.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la ciclina G2/mitótica específica es Clb2 o Clb1.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha línea celular es una línea celular anfitriona comodín o una línea celular productora que está diseñada para producir dicho regulador del ciclo celular y dicho PDI.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho PDI se selecciona del grupo que consiste en proteínas séricas, tales como una inmunoglobulina o albúmina sérica, enzimas, hormonas, moléculas de señalización, proteínas de la matriz, uno de sus fragmentos o derivados, o un polipéptido que interviene en la producción de un metabolito de la célula anfitriona.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha célula es una célula de levadura, tal como una célula del género *Pichia*, en especial una célula de una cepa de *P. pastoris*.
7. Línea celular fúngica muy productora que comprende un gen recombinado de interés que codifica una proteína de interés (PDI), que es una proteína o polipéptido heterólogo, en donde dicha línea celular ha integrado de forma estable en su genoma como un casete de expresión para expresar un regulador del ciclo celular que origina la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica, y en donde dicha línea celular produce dicho PDI con una productividad específica  $q_p$  de al menos  $0,1 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ .
8. Cultivo celular muy productor de una línea celular fúngica que comprende un gen recombinado de interés que codifica una proteína de interés (PDI), que es una proteína o polipéptido heterólogo, en donde dicha línea celular ha integrado de manera estable en su genoma un casete de expresión para expresar un regulador del ciclo celular que origina la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica, y en donde al menos el 50% de las células están en la fase G2+M durante un tiempo de proceso que es al menos el 50% del tiempo de alimentación.
9. Cultivo celular según la reivindicación 8, que está en un estado estacionario durante un período de al menos 10 horas.
10. Cultivo celular según la reivindicación 8 o 9, que es un cultivo celular discontinuo alimentado o continuo.
11. Cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que tiene una productividad volumétrica  $Q_p$  de al menos  $0,1 \mu\text{g}/(\text{l}\cdot\text{h})$  a escala industrial.
12. Método para aumentar el rendimiento de una producción de PDI recombinante en un cultivo celular, que comprende:
  - a) modificar genéticamente una línea celular de producción fúngica para sobreexpresar un regulador del ciclo celular que origina la prolongación de la fase G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica,
  - b) cultivar dicha línea celular de producción para obtener un cultivo celular en estado estacionario con una fase G2+M prolongada del ciclo celular,
  - c) seguido de cultivar dicho cultivo celular en estado estacionario para producir el PDI, y
  - d) recoger una fracción del cultivo celular que contiene el PDI,
- donde el PDI es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.
13. Método para prolongar una fase de producción de PDI recombinante de una línea celular de producción fúngica en un cultivo celular, que comprende modificar genéticamente la línea celular para sobreexpresar un regulador del ciclo celular que origina la prolongación del ciclo de fase la G2+M del ciclo celular en un cultivo celular, cuyo regulador del ciclo celular es una ciclina G2/mitótica específica, y en donde el PDI es un polipéptido o proteína recombinante heterólogo.

Fig. 1

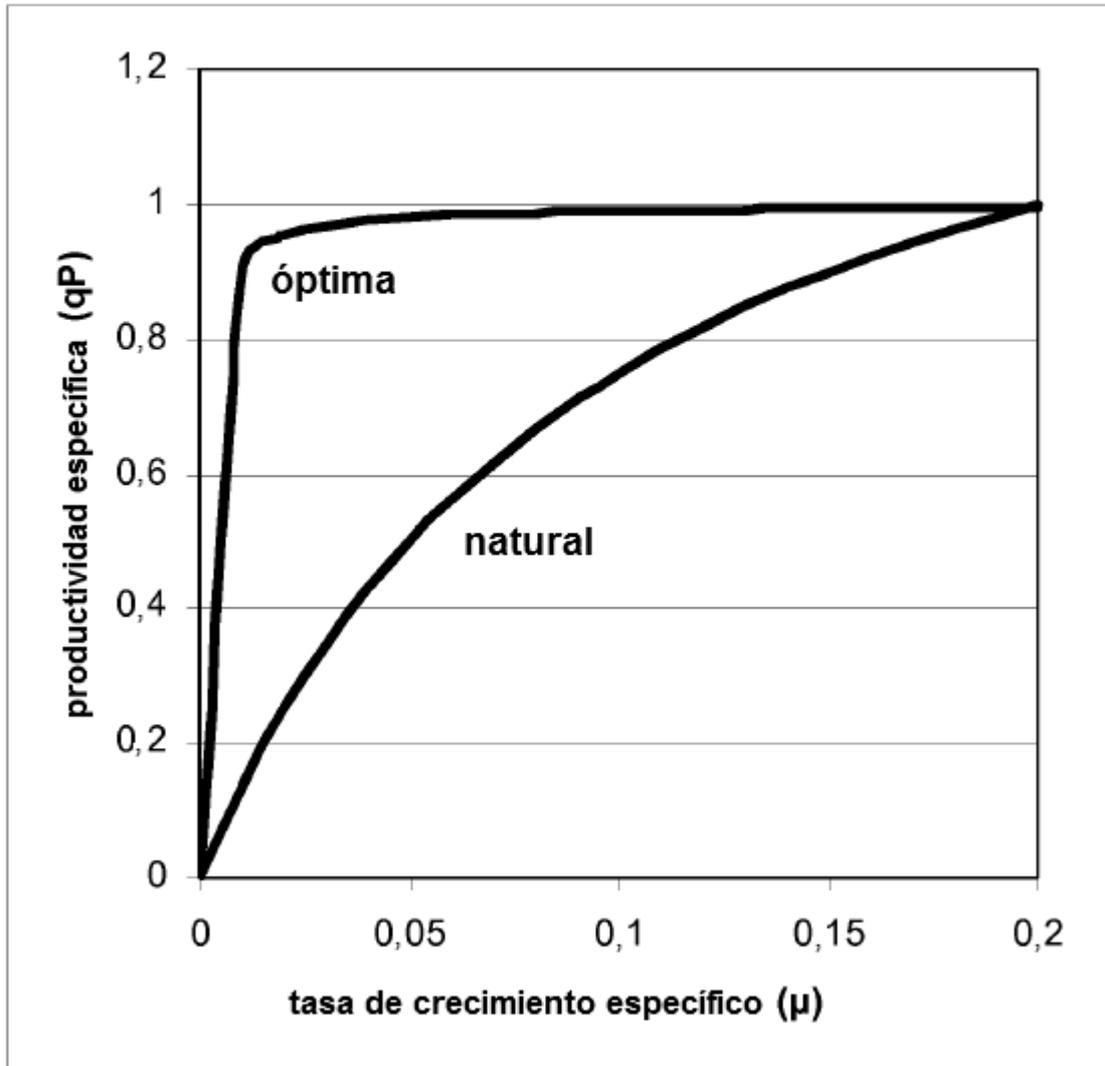


Fig. 2:

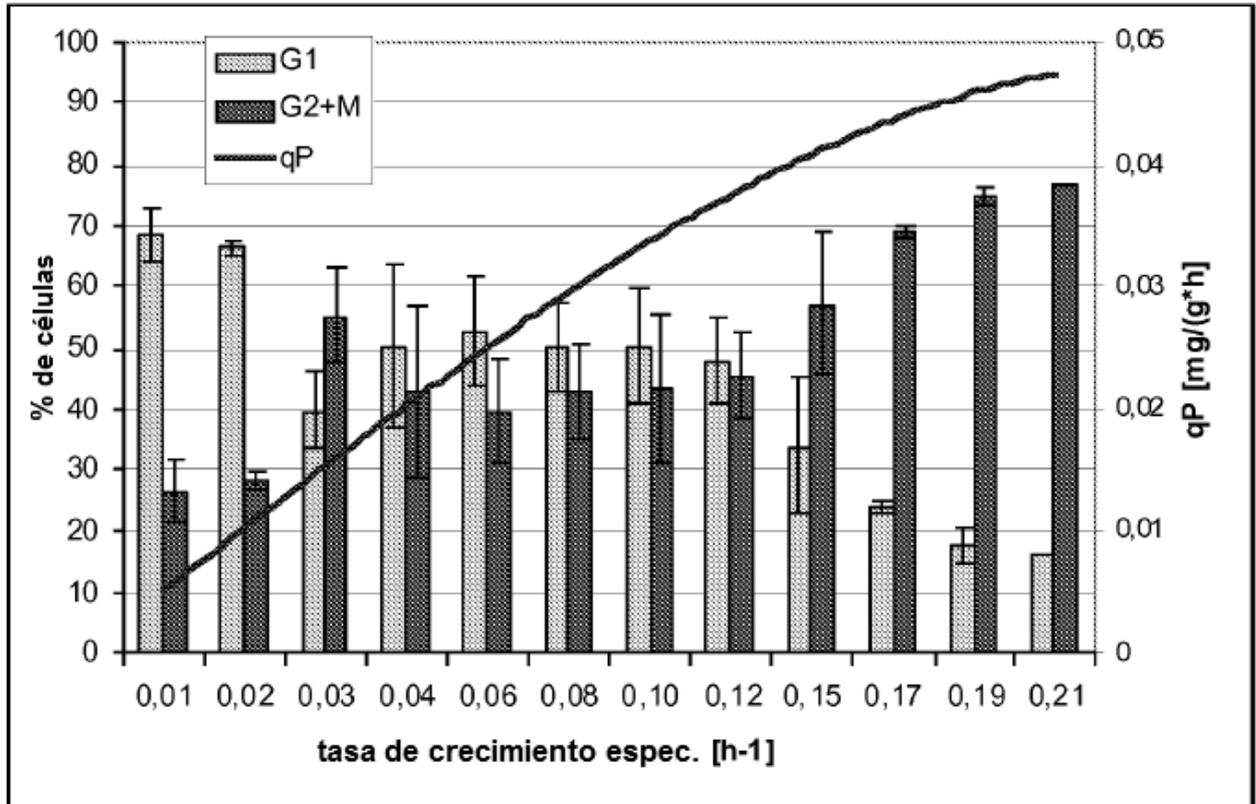


Fig. 3

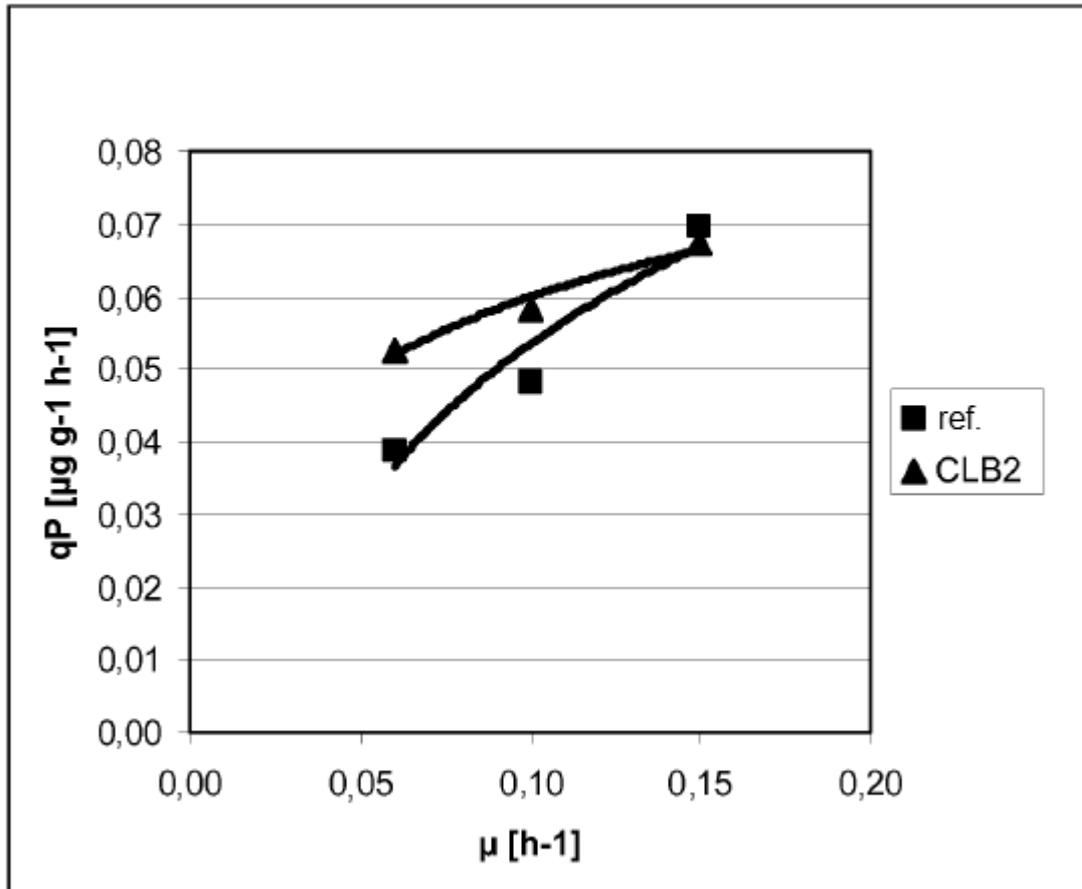


Fig. 4

