

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 044**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2014 PCT/EP2014/053171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2014 E 14706005 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2959006**

54 Título: **Uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos para la producción recombinante de un polipéptido**

30 Prioridad:

22.02.2013 EP 13156288

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

30.10.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KOPETZKI, ERHARD y
SCHANTZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 688 044 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

5 Uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos para la producción recombinante de un polipéptido

La presente invención se encuentra en el campo de la producción de polipéptidos recombinantes. Más precisamente, en el presente documento se informa de un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido no glucosilado que usa una cepa procariota con supresión de auxotrofias en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente.

10 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años, la producción de polipéptidos terapéuticos se ha incrementado constantemente y es probable que los polipéptidos terapéuticos se conviertan en el grupo más grande de medicamentos disponibles para el tratamiento de diversas enfermedades en un futuro próximo. El impacto de los polipéptidos terapéuticos procede de su especificidad, tal como el reconocimiento de dianas y/o la función de unión específicos.

Los cultivos celulares se usan en procedimientos fermentativos para producir sustancias y, en particular, polipéptidos. Se hace una distinción entre los procedimientos en los que los cultivos celulares no se modifican genéticamente y forman sus productos metabólicos endógenos y los procedimientos en los que los organismos se modifican genéticamente de tal manera que produzcan una cantidad más grande de sus sustancias endógenas, tales como polipéptidos, o bien produzcan sustancias exógenas. A los organismos que producen las sustancias se les suministra un medio de nutrientes que garantiza la supervivencia de los organismos y posibilita la producción del compuesto diana deseado. Se conocen numerosos medios de cultivo para estos propósitos que posibilitan un cultivo óptimo del huésped específico.

El uso de un medio mínimo de crecimiento definido químicamente en el cultivo de una célula recombinante para la producción recombinante de polipéptidos terapéuticos es ventajoso. Posibilita un fácil desarrollo del procesamiento y purificación posteriores del polipéptido terapéutico producido, proporciona un sólido procedimiento de producción debido a las diferencias minimizadas en las materias primas y reduce los costes de los productos.

Un medio mínimo de crecimiento definido químicamente no comprende aminoácidos libres y se requiere que use líneas de células protótrofas que tengan vías metabólicas inalteradas para producir los aminoácidos requeridos a partir de los componentes disponibles del medio mínimo de crecimiento definido químicamente.

Por ejemplo, cuando se usa *E. coli* como línea de células huésped, en general, se emplean cepas naturales, tales como MG1655, W3110 o BL21. Estas cepas muestran buenas características de crecimiento, pero un valor de producto inferior.

Las cepas procariotas mutantes, que se han obtenido mediante selección y mutagénesis no dirigida, muestran profundas diferencias en su ADN genómico en comparación con las cepas naturales. Las cepas mutantes se han seleccionado basándose en el valor de producto máximo que se puede obtener. Como las cepas mutantes albergan una serie de auxotrofias, no se pueden usar para su cultivo en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente. Las cepas mutantes requieren la alimentación de aminoácidos para complementar sus auxotrofias, lo que daba como resultado costes de cultivo incrementados.

El documento US 5.932.439 informa de cepas de *Escherichia coli* K-12 para la producción de proteínas recombinantes.

El documento WO 2012/028526 informa de una proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I. El documento EP 0 972 383 informa de un sistema huésped/vector de *E. coli* que posibilita una selección de plásmidos libre de antibióticos mediante complementación de una auxotrofia en *E. coli* (*pyrF*).

Vidal *et al.* informaron del desarrollo de un sistema de selección de plásmidos libre de antibióticos basado en la auxotrofia para glicina para la sobreproducción recombinante de proteínas en *Escherichia coli* (J. Biotechnol. 134 (2008) 127-136).

Schmidt, M., *et al.* informaron sobre la superación de la auxotrofia para isoleucina de BLR(DE3) de *Escherichia coli* para producir de manera recombinante proteínas de seda de araña en medios mínimos (Biotechnol. Lett. 29 (2007) 1741-1744).

Huang, C., *et al.* informaron de la producción industrial de medicamentos recombinantes en *Escherichia coli* y sus avances recientes (J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39 (2012) 383-399).

65 **Sumario**

La invención se define por las reivindicaciones.

5 Suprimiendo en una cepa procariota auxótrofa una o más de sus auxotrofias, la cepa con supresión de auxotrofias puede crecer en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente al que ya no se necesita añadir la sustancia correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido. En el caso de sustancias costosas, se puede lograr una reducción de los costes de los productos y se puede producir de manera más económica un polipéptido recombinante.

10 Además del restablecimiento de la capacidad de crecer en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente en ausencia de la sustancia correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido, se ha descubierto que el valor de producto obtenible se puede mantener o incluso incrementar en comparación con la cepa sin supresión. Además, se ha descubierto que el valor de producto obtenible usando una cepa procariota con supresión de auxotrofias es más alto que el valor de producto que se puede obtener con una cepa protótrofa natural correspondiente.

15 Sin comprometerse con esta teoría, se supone que una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos como se informa en el presente documento tiene un metabolismo y flujos metabólicos diferentes en comparación con una cepa protótrofa natural correspondiente en la que no se han realizado dichas delección y supresión. Por tanto, la inactivación y reactivación de determinadas enzimas en una cepa procariota tiene un efecto detectable/pronunciado sobre todo el metabolismo de la cepa, lo que se puede ver, por ejemplo, en la productividad incrementada de dicha cepa en comparación con una cepa protótrofa natural correspondiente.

20 En el presente documento se divulga una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que

- 25
- se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la cepa puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la cepa procariota con supresión de auxotrofias.

30 En un modo de realización, la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

35 En el presente documento se divulga una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que

- 40
- se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la célula puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

45 En un modo de realización, la célula procariota con supresión de auxotrofias es una célula de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

50 Se puede usar la cepa/célula procariota con supresión de auxotrofias como se informa en el presente documento en un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido terapéutico, en el que, en comparación con la cepa/célula sin supresión de auxotrofias, no se requiere el enriquecimiento con al menos un residuo de aminoácido.

55 Un aspecto de la invención es un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende las siguientes etapas:

- 60
- suprimir en una célula procariota que es auxótrofa para al menos un aminoácido al menos una auxotrofia para un aminoácido introduciendo en el genoma de una célula procariota original un ácido nucleico que suprima una auxotrofia para aminoácidos de la célula procariota original,
 - 65 - cultivar la célula procariota (recombinante) con supresión de auxotrofias para aminoácidos que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio

60 en el que el valor de producto cuando se usa la cepa procariota con supresión de auxotrofias es más alto que el valor de producto que se puede obtener con una cepa protótrofa natural correspondiente.

65 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, la célula procariota con supresión de auxotrofias tiene al menos una auxotrofia para aminoácidos (sin supresión) adicional. Esta auxotrofia se puede usar para la selección de recombinantes/transformantes después de la introducción de uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés (el polipéptido).

5 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el crecimiento de la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos en comparación con la célula procariota sin supresión (célula original) en las mismas condiciones de cultivo y en el mismo medio de crecimiento requiere el enriquecimiento con menos aminoácidos en el medio de crecimiento.

10 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el medio mínimo de crecimiento definido químicamente está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

15 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el cultivo de la célula procariota con supresión de auxotrofias requiere el enriquecimiento con uno o dos o tres o cuatro aminoácidos menos en el medio de crecimiento que el requerido para el cultivo de la célula procariota sin supresión de auxotrofias (original/célula original).

20 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias no se añade durante el cultivo.

25 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el cultivo es en ausencia del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

30 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, la célula procariota es una célula de *E. coli*.

35 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.

40 En un modo de realización de todos los procedimientos para producir un polipéptido, el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.

45 En el presente documento se divulga el uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos para la producción (recombinante) de un polipéptido.

- 50 En un modo de realización,
- en la cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la cepa con supresión de auxotrofias para aminoácidos puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la cepa procariota con supresión de auxotrofias.

55 En un modo de realización, la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

60 En un modo de realización, el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.

65 En un modo de realización, el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.

70 En un modo de realización de todos los aspectos, la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa no lisógena. Una cepa lisógena está infectada con un bacteriófago temporal, es decir, una cepa no lisógena está libre de bacteriófagos.

75 En un modo de realización de todos los aspectos, la supresión es una supresión dirigida que selecciona como diana solo la auxotrofia para aminoácidos.

80 En un modo de realización de todos los aspectos, la supresión es la introducción de una o más enzimas requeridas para la síntesis del aminoácido auxótrofo.

85 En un modo de realización de todos los aspectos, la cepa procariota tiene el genotipo thi-1, Δ ompT, Δ pyrF.

Descripción detallada

Un objeto en el desarrollo de los procedimientos de producción de polipéptidos recombinantes a gran escala es la reducción de la cantidad requerida, es decir, el consumo, de componentes del medio durante el cultivo. Especialmente la reducción del consumo de componentes del medio costosos, tales como los aminoácidos, es ventajosa en vista de los costes de los productos.

Este objeto se ha logrado suprimiendo en una cepa auxótrofa para aminoácidos al menos una, algunas o todas sus auxotrofias para aminoácidos a fin de evitar la alimentación de aminoácidos costosos y, con ello, reducir los costes de la producción recombinante de un polipéptido de interés. Adicionalmente, se puede usar un medio definido químicamente que dé como resultado una estabilidad del procedimiento mejorada y facilite el procesamiento posterior (DSP).

Por tanto, en el presente documento se informa de un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido no glucosilado que usa una cepa procariota con supresión de auxotrofias en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente.

Se ha descubierto que suprimiendo en una cepa procariota auxótrofa una o más de sus auxotrofias, la cepa con supresión de auxotrofias puede crecer en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente al que ya no se necesita añadir la sustancia correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido. En el caso de sustancias costosas, tales como, por ejemplo, los aminoácidos, se puede lograr una reducción de los costes de los productos y se puede producir de manera más económica un polipéptido recombinante.

Además del restablecimiento de la capacidad de crecer en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente en ausencia de la sustancia correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido, se ha descubierto que el valor de producto obtenible se puede mantener o incluso incrementar. Además, se ha descubierto que el valor de producto obtenible usando una cepa procariota con supresión de auxotrofias es más alto que el valor de producto que se puede obtener con una cepa protótrofa natural correspondiente.

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota, que comprende la siguiente etapa:

- cultivar una célula procariota, que se ha obtenido introduciendo en el genoma de una célula procariota original un ácido nucleico que suprime una auxotrofia para aminoácidos en la célula procariota original, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio.

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota, que comprende las siguientes etapas:

- suprimir en una célula procariota que es auxótrofa para al menos un aminoácido al menos una auxotrofia para un aminoácido,
- cultivar la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio.

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende la siguiente etapa:

- cultivar una célula procariota (recombinante) que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio,

en el que la célula procariota (recombinante) es una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos,

en el que el crecimiento de la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos en comparación con la célula procariota sin supresión (célula original) en las mismas condiciones de cultivo y en el mismo medio de crecimiento requiere el enriquecimiento con menos aminoácidos en el medio de crecimiento, y

en el que el medio mínimo de crecimiento definido químicamente está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

Una "célula procariota auxótrofa para aminoácidos" es una célula procariota que no puede sintetizar un aminoácido esencial, por ejemplo, debido a una mutación o delección en un locus génico que comprende el gen estructural que

codifica las proteínas de la vía de biosíntesis correspondiente. Sin la adición del aminoácido respectivo al medio de cultivo, la célula no puede proliferar. La auxotrofia puede ser para cualquier aminoácido. La célula procariota también puede ser auxótrofa para más de un aminoácido. Por tanto, en un modo de realización, la célula procariota auxótrofa para aminoácidos es auxótrofa para al menos dos aminoácidos. En otro modo de realización, la célula procariota auxótrofa para aminoácidos es auxótrofa para al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco aminoácidos. En un modo de realización adicional, la célula procariota auxótrofa para aminoácidos es auxótrofa para al menos 2 y hasta 5, o hasta 10, o hasta 15 aminoácidos. En otro modo de realización, la célula procariota auxótrofa para aminoácidos es auxótrofa para de dos a cinco aminoácidos, o de dos a tres aminoácidos, o para dos aminoácidos, o para tres aminoácidos, o para cuatro aminoácidos. En un modo de realización, la célula con supresión de auxotrofias (para aminoácidos) tiene al menos una auxotrofia para un aminoácido, o al menos auxotrofias para dos aminoácidos, o al menos auxotrofias para tres aminoácidos, o auxotrofias para desde uno a tres aminoácidos o auxotrofias para dos aminoácidos.

En un modo de realización, la célula procariota auxótrofa para aminoácidos es una célula bacteriana.

En un modo de realización, la célula es una célula de *Escherichia*, o una célula de *Bacillus*, o una célula de *Lactobacillus*, o una célula de *Corynebacterium* o una célula de levadura (*Saccharomyces*, *Candida* o *Pichia*). En un modo de realización adicional, la célula es una célula de *Escherichia coli*, o una célula de *Bacillus subtilis*, o una célula de *Lactobacillus acidophilus*, o una célula de *Corynebacterium glutamicum* o una célula de levadura de *Pichia pastoris*.

Las células procariotas que se pueden usar en el procedimiento como se informa en el presente documento pueden comprender una o más auxotrofias para aminoácidos. Por ejemplo, las células de *E. coli* deficitarias en la vía de biosíntesis de leucina se pueden seleccionar de las células deficitarias en LeuB6 13-6, χ 148, χ 156, χ 2224, χ 462, χ 463, χ 474, χ 478, χ 515, χ 65, χ 697, χ 760, 2000k MSE248, 342-167, 342MG, 679-680, A586, A592, A593, AA100, AA7852, AA787, AB1102, AB1111, AB1115, AB1122, AB1129, AB113, AB1132, AB1133, AB114, AB1157, AB1157-D, AB1314, AB1330, AB1331, AB1881, AB1884, AB1885, AB188, CP78, CP79, CR34 Thy-, CR34 Thy- SR, CR34/308, CR34/313, CR34/399, CR34/43, CR34/454, CR34/500, CR34/7a, CS130, CS312, CS419, CS425, CS426, CS460, CS471, CS472, CS50, CS81, CS85, CSR06, CSR603, CSR603/pDR1996, CT28-3b, DA10, DA11, DB1161, DB1257, DE1878, DE1882, DE2345, DF225, DF41, JRG94, JS10 C600r-m-, T6R, P678SSR pro-, PA20SR, PA200 SR, PA201 SR, PA214SRT6R, PA265 SR, PA309, PDE70, PA340, PA340/T6, PA360, PA414, PAM161, PAM162, PAM163, PAM164, PAM660, PAT84, PB349, PB69, PCI, PC2, PC3, PC5, PC6, PC8, PJ1, PJ2, PJ3, PJ4, PJ5, PJ C600 (= CRSR), W208 SR AzR, W2660, LAM-, W945his, WA2127, WA2379, WA2548, WA2552, WA2574, WA2899, WA921, WA946, WA960, Y10, Y46, Y53, Y70, YYC100.

En un modo de realización, la célula procariota es una célula de *E. coli* K12 o una célula de *E. coli* B.

El término "crecimiento" se refiere al cambio de la densidad de células viables en un cultivo. Este cambio puede ser un cambio con el tiempo. La densidad de células viables se puede determinar determinando la densidad óptica a 578 nm.

En un modo de realización, el crecimiento es el incremento de la densidad de células viables durante un periodo de tiempo. En un modo de realización, el periodo de tiempo es el periodo de tiempo de 0 a 30 horas de cultivo después de la inoculación.

El término "mismo" indica que un segundo valor está dentro de +/- 20 % de un primer valor. Con respecto a las condiciones de cultivo, el término "mismo" se refiere al tiempo de cultivo, volumen de cultivo, temperatura de cultivo, densidad de células de siembra, tasa de oxigenación, valor de pH, velocidad del agitador, tasa de alimentación (si es aplicable), etc. Con respecto al medio de cultivo, el término "mismo" indica que un segundo medio en comparación con un primer medio difiere en 5 componentes como máximo (difiere = presencia o ausencia).

En un modo de realización, las mismas condiciones de cultivo son las condiciones de cultivo idénticas. En un modo de realización, el mismo medio de cultivo es el medio de cultivo idéntico.

Los procedimientos para cultivar una célula procariota y también para cultivar una célula procariota auxótrofa para aminoácidos se conocen por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Riesenber, D., *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991) 380-384).

El cultivo puede ser con cualquier procedimiento. En un modo de realización, el cultivo es un cultivo por lotes, un cultivo por lote alimentado, un cultivo con perfusión, un cultivo semicontinuo o un cultivo con retención celular completa o parcial.

En un modo de realización, el cultivo es un cultivo de alta densidad de células. El término "cultivo de alta densidad de células" indica un procedimiento de cultivo en el que el peso seco de células de la célula procariota cultivada en un punto del cultivo es de al menos 10 g/l. En un modo de realización, el peso seco de células en un punto del cultivo es de al menos 20 g/l, o al menos 50 g/l, o al menos 100 g/l o más de 100 g/l. A fin de alcanzar dicho estado

de alta densidad de células, el volumen de las soluciones de alimentación y/o ajuste añadido durante el cultivo ha de ser lo más pequeño posible. Se informa de los procedimientos para la determinación del peso seco de células, por ejemplo, en Riesenberg, D., *et al*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 (1990) 77-82.

- 5 Los nutrientes en el medio proporcionado se metabolizarán durante el cultivo y se han de reponer a fin de evitar una limitación.

experimento n.º	cepa procariota/plásmido de expresión	medio mínimo definido químicamente +	valor de producto	véase el ejemplo
1	CSPZ-2/5816	Leu, Pro	16,1 g/l	3
2	CSPZ-6/5816	Leu, Pro	19,2 g/l	3
5	CSPZ-6/5816	-	20,8 g/l	5
6	MG1655 (Δ pyrF)/5816	-	10,9 g/l	5

- 10 A partir de la comparación del experimento n.º 1 con el experimento n.º 2, se puede ver que con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias se puede lograr un valor más alto que con su cepa CSPZ-2 original en las mismas condiciones de cultivo, es decir, la cepa con supresión de auxotrofias tiene una productividad incrementada (productividad volumétrica, tiempo-espacio-rendimiento).

- 15 A partir de la comparación del experimento n.º 2 con el experimento n.º 5, se puede ver que la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias no requiere la adición de los aminoácidos prolina y leucina para la producción recombinante. Se puede lograr un valor de producto comparable o incluso ligeramente incrementado en ausencia de prolina y leucina.

- 20 A partir de la comparación del experimento n.º 5 con el experimento n.º 6, se puede ver que con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias se puede lograr un valor más alto que con una cepa natural correspondiente (MG 1655 (Δ pyrF)) en las mismas condiciones de cultivo.

experimento n.º	cepa procariota/plásmido de expresión	medio mínimo definido químicamente +	valor de producto	véase el ejemplo
7	CSPZ-6/5830	-	22,6 g/l	6
8	66C5/5830	-	2,3 g/l	6
9	66C5/5830	-	6,9 g/l	6 (temperatura elevada)

- 25 El valor de producto obtenible con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias también se ha comparado con el valor de producto obtenible con otra cepa W3110 natural correspondiente (66C5 = Δ pyrF de W3110).

- A partir de la comparación del experimento n.º 7 con el experimento n.º 8, se puede ver que con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias se puede lograr un valor más alto que con una cepa natural correspondiente (W3110) en las mismas condiciones de cultivo.

- 30 A partir de la comparación del experimento n.º 7 con el experimento n.º 9, se puede ver que con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias se puede lograr un valor más alto que con una cepa natural correspondiente (W3110) incluso si se usan condiciones de cultivo mejoradas (temperatura elevada) para la cepa natural, pero no para la cepa con supresión de auxotrofias.

35

experimento n.º	cepa procariota/plásmido de expresión	medio mínimo definido químicamente +	valor de producto	véase el ejemplo
10	CSPZ-6/5836	-	33,8 g/l	7
11	CSPZ-14/5836	-	9,6 g/l	7

El valor de producto obtenible con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias también se ha comparado con el valor de producto obtenible con otra cepa BL-21 natural correspondiente (CSPZ-14 = Δ pyrF de BL21).

- 40 A partir de la comparación del experimento n.º 10 con el experimento n.º 11, se puede ver que con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias se puede lograr un valor más alto que con una cepa natural correspondiente (BL-21) en las mismas condiciones de cultivo.

- 45 En el presente documento se divulga una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que

- se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial,
- la cepa puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido

correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la cepa procariota con supresión de auxotrofias, y

- la productividad de la cepa con supresión de auxotrofias se mejora en comparación con la productividad de la cepa original sin supresión de auxotrofias, así como en comparación con las cepas naturales correspondientes (genotipo correspondiente).

En un modo de realización, la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

En el presente documento se divulga una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que

- se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
- la célula puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

En un modo de realización, la célula procariota con supresión de auxotrofias es una célula de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

Se puede usar la cepa/célula procariota con supresión de auxotrofias como se informa en el presente documento en un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido terapéutico, en el que, en comparación con la cepa/célula sin supresión de auxotrofias, no se requiere el enriquecimiento con al menos un residuo de aminoácido.

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende la siguiente etapa:

- cultivar una célula procariota (recombinante) que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio,

en el que la célula procariota (recombinante) es una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos.

En un modo de realización, el crecimiento de la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos en comparación con la célula procariota sin supresión (célula original) en las mismas condiciones de cultivo y en el mismo medio de crecimiento requiere el enriquecimiento con menos aminoácidos en el medio de crecimiento.

En un modo de realización, el medio mínimo de crecimiento definido químicamente está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

En un modo de realización, el cultivo de la célula procariota con supresión de auxotrofias requiere el enriquecimiento con uno o dos o tres o cuatro aminoácidos menos en el medio de crecimiento que el requerido para el cultivo de la célula procariota sin supresión de auxotrofias (célula original).

En un modo de realización, la célula procariota con supresión de auxotrofias tiene al menos una auxotrofia para aminoácidos (sin supresión) adicional.

En un modo de realización, el aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias no se añade durante el cultivo.

En un modo de realización, el cultivo es en ausencia del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

En un modo de realización, la célula procariota es una célula de *E. coli*.

En un modo de realización, el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.

En un modo de realización, el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.

En un modo de realización, la densidad de células viables a las 30 horas después de la inoculación del cultivo es más alta en el cultivo de la cepa con supresión de auxotrofias que en el cultivo de la célula procariota sin supresión.

En el presente documento se divulga el uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos

para la producción (recombinante) de un polipéptido.

En un modo de realización,

- 5
- en la cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la cepa con supresión de auxotrofias para aminoácidos puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en
- 10 la cepa procariota con supresión de auxotrofias.

En un modo de realización, la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.

- 15
- En un modo de realización, el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.

20

En un modo de realización, el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.

En un modo de realización, el procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota comprende la siguiente etapa:

- 25
- cultivar una célula procariota que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio,

en el que la célula procariota es una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos,

- 30
- en el que el crecimiento de la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos en comparación con la célula procariota sin supresión en las mismas condiciones de cultivo y en el mismo medio de crecimiento requiere el enriquecimiento con menos aminoácidos en el medio de crecimiento, y

- 35
- en el que el medio mínimo de crecimiento definido químicamente está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.

Modos de realización ejemplares

Se divulgan los siguientes modos de realización ejemplares.

- 40
1. Una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que
 - se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la cepa puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la cepa procariota con supresión de auxotrofias.
 2. La cepa de acuerdo con el punto 1, caracterizada por que la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.
 3. Una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos, caracterizada por que
 - se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la célula puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.
 4. La cepa de acuerdo con el punto 3, caracterizada por que la célula procariota con supresión de auxotrofias es una célula de *E. coli* con supresión de auxotrofias.
 5. Un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende la siguiente etapa:
 - cultivar una célula procariota (recombinante), que se ha obtenido introduciendo en el genoma de una
- 65

célula procariota original un ácido nucleico que suprime una auxotrofia para aminoácidos en la célula procariota original, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio.

- 5
6. Un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende las siguientes etapas:
- 10
- suprimir en una célula procariota que es auxótrofa para al menos un aminoácido al menos una auxotrofia para un aminoácido,
 - cultivar la célula procariota (recombinante) con supresión de auxotrofias para aminoácidos que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio.
- 15
7. Un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota (recombinante), que comprende la siguiente etapa:
- 20
- cultivar una célula procariota (recombinante) que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio,
- 25
- en el que la célula procariota (recombinante) es una célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos.
8. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 7, caracterizado por que la célula procariota con supresión de auxotrofias tiene al menos una auxotrofia para aminoácidos (sin supresión) adicional.
- 30
9. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 8, caracterizado por que el crecimiento de la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos en comparación con la célula procariota sin supresión (célula original) en las mismas condiciones de cultivo y en el mismo medio de crecimiento requiere el enriquecimiento con menos aminoácidos en el medio de crecimiento.
- 35
10. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 9, caracterizado por que el medio mínimo de crecimiento definido químicamente está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.
- 40
11. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 10, caracterizado por que el cultivo de la célula procariota con supresión de auxotrofias requiere el enriquecimiento con uno o dos o tres o cuatro aminoácidos menos en el medio de crecimiento que el requerido para el cultivo de la célula procariota sin supresión de auxotrofias (original/célula original).
- 45
12. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 11, caracterizado por que el aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias no se añade durante el cultivo.
- 50
13. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 12, caracterizado por que el cultivo es en ausencia del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.
- 55
14. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 13, caracterizado por que la célula procariota es una célula de *E. coli*.
- 60
15. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 14, caracterizado por que el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.
- 65
16. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 15, caracterizado por que el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.
17. Uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos para la producción (recombinante) de un polipéptido.

18. El uso de acuerdo con el punto 17, caracterizado por que
- en la cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos se ha suprimido al menos una insuficiencia en la vía metabólica de un aminoácido esencial, y
 - la cepa con supresión de auxotrofias para aminoácidos puede crecer en medio mínimo de crecimiento definido químicamente que está libre del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la cepa procariota con supresión de auxotrofias.
19. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 18, caracterizados por que la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias.
20. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 19, caracterizados por que el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.
21. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 20, caracterizados por que el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.
22. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 21, caracterizados por que la cepa procariota con supresión de auxotrofias es una cepa no lisógena.
23. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 22, caracterizados por que la supresión es una supresión dirigida que selecciona como diana solo la auxotrofia para aminoácidos.
24. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 23, caracterizados por que la supresión es la introducción de una o más enzimas requeridas para la síntesis del aminoácido auxótrofo.
25. La cepa o procedimiento o uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 24, caracterizados por que la cepa procariota tiene el genotipo *thi-1, ΔompT, ΔpyrF*.

Se proporcionan los siguientes ejemplos, secuencias y figuras para contribuir al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

- SEQ ID NO: 01** Secuencia derivada de interferón humano.
- SEQ ID NO: 02** Marcador de afinidad de hexahistidina.
- SEQ ID NO: 03** Sitio de escisión por proteasa de IgA.
- SEQ ID NO: 04** Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I.
- SEQ ID NO: 05** Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I extendido N terminal obtenida después de la escisión por proteasa de IgA.
- SEQ ID NO: 06** Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I sin marcador de afinidad y escisión por proteasa de IgA (polipéptido de fusión acortado N terminal).

Descripción de las figuras

- Figura 1** Comparación del crecimiento de la cepa CSPZ-2 original (rombos) y de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (triángulos).
- Figura 2** Comparación del rendimiento de producto de la cepa CSPZ-2 original (rombos) y de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (triángulos).
- Figura 3** A: gráfico de tendencia de la concentración de L-leucina (CSPZ-2: rombos; CSPZ-6: triángulos).
B: gráfico de tendencia de la concentración de L-prolina (CSPZ-2: rombos; CSPZ-6: triángulos).
- Figura 4** Comparación del crecimiento de la cepa con supresión de auxotrofias y natural en medio con y sin enriquecimiento con aminoácidos (CSPZ-6 en MDQ enriquecido con L-leucina y L-prolina:

triángulo; CSPZ-6 en MDQ: cuadrados; cepa derivada de MG1655 en MDQ: "X").

- 5 **Figura 5** Comparación del rendimiento de producto de la cepa con supresión de auxotrofias y natural en medio con y sin enriquecimiento con aminoácidos (CSPZ-6 en MDQ enriquecido con L-leucina y L-prolina: triángulo; CSPZ-6 en MDQ: cuadrados; cepa derivada de MG 1655 en MDQ: "X").
- 10 **Figura 6** Comparación del crecimiento de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y de la cepa 66C5 natural (cuadrados) en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- 15 **Figura 7** Comparación del crecimiento de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos, temperatura normal), de la cepa 66C5 natural (cuadrados, temperatura normal) y de la cepa 66C5 natural a temperatura elevada (triángulos) en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- 20 **Figura 8** Comparación del rendimiento de producto de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y de la cepa 66C5 natural (cuadrados) en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- 25 **Figura 9** Comparación del rendimiento de producto de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos, temperatura normal), de la cepa 66C5 natural (cuadrados, temperatura normal) y de la cepa 66C5 natural a temperatura elevada (triángulos) en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- 30 **Figura 10** Comparación del crecimiento de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y de la cepa BL21 natural en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- 35 **Figura 11** Comparación del rendimiento de producto de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y de la cepa BL21 natural (cuadrados) en medio sin enriquecimiento con aminoácidos.
- Figura 12** Comparación del crecimiento de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y del derivado de la cepa MG 1655 natural (triángulos).
- Figura 13** Comparación del rendimiento de producto de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias (rombos) y del derivado de la cepa MG 1655 natural (triángulos).

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Técnicas de ADN recombinante:

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J., *et al*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1

Supresión de auxotrofia

En la cepa CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, thi-1, Δ pyrF) de *E. coli* K12 se suprimieron sus defectos genéticos en los genes leuB, proC, proBA y trpE. Esto se hizo usando un procedimiento para ingeniería genética dirigida de genes cromosómicos de *E. coli* (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania; <http://www.genebridges.com>; véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/29837, WO 01/04288, US 6.355.412). En detalle, se realizaron los siguientes cambios graduales:

Reparación del locus de leuB:

La CSPZ-2 de *E. coli* tiene una mutación puntual de TCG por TTG en el locus leuB que da como resultado un intercambio de los aminoácidos serina por leucina en la posición 286 en la 3-isopropilmalato deshidrogenasa correspondiente, lo que hace que esta enzima sea defectuosa. Por lo tanto, la cepa no puede crecer en medio de cultivo no enriquecido con L-leucina. Con un oligonucleótido que codifica Ser286 natural con secuencias flanqueantes, se intercambi6 la mutación gen6mica en la cepa CSPZ-2 para generar la cepa CSPZ-3 con supresión (CSPZ-2 leuB⁺), que puede crecer en placas con medio M9 enriquecidas con L-prolina, pero que no requieren L-leucina.

Reparación de los locus de proC (b0386) y proBA (b0242 y b0243):

5 La cepa CSPZ-3 todavía requiere el enriquecimiento con prolina para crecer en un medio mínimo M9. Una amplificación por PCR del locus de proC dio como resultado un fragmento de aprox. 2,4 kb. Para *E. coli* K12 (cepa natural) se esperaba un fragmento de 1.024 pb (Blattner, F.R., *et al.*, Science 277 (1997) 1453-1474). La secuenciación del producto de PCR reveló la inactivación del locus de proC mediante la transposición de IS 186 (1.335 pb) en el genoma. El locus de proBA se caracterizó por PCR, pero la amplificación no indicó la ausencia del operón proBA.

10 Se usó un producto de PCR amplificado a partir de ADN genómico de la cepa MG1655 de *E. coli* para la recombinación Red/ET para suprimir la insuficiencia en el locus de proC.

15 En una etapa consecutiva, se insertó el operón proBA por medio de recombinación Red/ET en la región intergénica infA-serW del genoma para restablecer el fenotipo protótrofo en CSPZ-4. La integración se verificó amplificando por PCR y secuenciando el sitio de integración y plaqueando en placas de agar con medio mínimo M9. La cepa con supresión de auxotrofias protótrofa para prolina se denominó CSPZ-5.

Reparación del locus de trpE (b1264):

20 La secuenciación de ADN del locus de trpE de la cepa CSPZ-2 original reveló la delección de 9 nucleótidos, lo que dio como resultado la pérdida de Glu139, Glu 140 y Arg141. Esta mutación no da lugar a un fenotipo auxótrofo para triptófano, pero puede afectar la actividad enzimática y dar lugar a un crecimiento reducido. Por lo tanto, el locus de TrpE mutado se intercambió por el locus natural por medio de recombinación Red/ET. El restablecimiento con éxito del gen trpE se confirmó mediante secuenciación y la cepa resultante se denominó CSPZ-6.

25

Ejemplo 2**Preparación de los plásmidos de expresión****30 Polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I**

El polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I se preparó mediante medios recombinantes. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión expresado en dirección N a C terminal es como sigue:

- 35
- el aminoácido metionina (M),
 - un fragmento de una secuencia de interferón que tiene la secuencia de aminoácidos de CDLPQTHSL (SEQ ID NO: 01),

40

 - un enlazador de GS,
 - un marcador de hexahistidina que tiene la secuencia de aminoácidos de HHHHHH (SEQ ID NO: 02),

45

 - un enlazador de GS,
 - un sitio de escisión por proteasa de IgA que tiene la secuencia de aminoácidos de VVAPPAP (SEQ ID NO: 03), y

50

 - una tetranectina-apolipoproteína A-I que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 04.

Los polipéptidos de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I como se describe anteriormente son polipéptidos precursores a partir de los que se liberaron los polipéptidos de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I mediante escisión enzimática *in vitro* usando proteasa de IgA.

55 El gen de fusión codificante del polipéptido precursor se ensambló con procedimientos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de segmentos de ácido nucleico apropiados. Las secuencias de ácido nucleico preparadas mediante síntesis química se verificaron mediante secuenciación de ADN. El plásmido de expresión para la producción de tetranectina-apolipoproteína A-I se preparó como sigue.

60 Preparación de los plásmidos de expresión en *E. coli***a) Plásmido 5816**

65 El plásmido 4980 (4980-pBRori-URA3-LACI-SAC) es un plásmido de expresión para la expresión de estreptavidina de núcleo en *E. coli*. Se generó mediante fijación del fragmento del vector EcoRI/CellIII de 3142 pb de longitud derivado del plásmido 1966 (1966-pBRori-URA3-LACI-T-repetición, que se informa en el documento EP-B 1 422

237) con una estreptavidina de núcleo de 435 pb de longitud que codifica el fragmento EcoRI/CeIII.

El plásmido de expresión en *E. coli* para estreptavidina de núcleo comprende los siguientes elementos:

- 5 - el origen de replicación del vector pBR322 para su replicación en *E. coli* (correspondiente a la posición de pb 2517-3160 de acuerdo con Sutcliffe, G., *et al.*, Quant. Biol. 43 (1979) 77-90),
- el gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (Rose, M. *et al.* Gene 29 (1984) 113-124) que permite la selección de plásmidos mediante complementación de cepas mutantes pyrF de *E. coli* (auxotrofia para uracilo),
- 10 - el casete de expresión de estreptavidina de núcleo que comprende
 - 15 - el promotor híbrido T5 (promotor híbrido T5-PN25/03/04 de acuerdo con Bujard, H., *et al.*, Methods Enzymol. 155 (1987) 416-433 y Stueber, D., *et al.*, Immunol. Methods IV (1990) 121-152), que incluye un sitio de unión al ribosoma sintético de acuerdo con Stueber, D., *et al.* (véase anteriormente),
 - el gen estreptavidina de núcleo,
 - 20 - dos finalizadores de la transcripción derivados de bacteriófagos, el finalizador λ-T0 (Schwarz, E., *et al.* Nature 272 (1978) 410-414) y el finalizador fd (Beck E. y Zink, B. Gene 1-3 (1981) 35-58),
 - el gen represor lacI de *E. coli* (Farabaugh P.J. Nature 274 (1978) 765-769).

25 El plásmido de expresión final 5816 para la expresión del polipéptido precursor tetranectina-apolipoproteína A-I se preparó cortando el gen estructural estreptavidina de núcleo del plásmido 4980 usando el sitio de escisión para las endonucleasas de restricción EcoRI y CeIII flanqueante único e insertando el ácido nucleico flanqueado por el sitio de restricción para EcoRI/CeIII que codifica el polipéptido precursor en el fragmento del vector EcoRI/CeIII-4980 de 3142 pb de longitud.

30 **b) Plásmido 5830**

El plásmido 5830 es idéntico al plásmido 5816, excepto en que los codones que codifican el tripéptido QKK se cambian de caa aaa aag (plásmido 5816) a cag aag aag (plásmido 5830).

35 **c) Plásmido 5836**

El gen de fusión codificante para la expresión de una proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I acortada se ensambla con procedimientos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de segmentos de ácido nucleico apropiados. Las secuencias de ácido nucleico preparadas mediante síntesis química se verifican mediante secuenciación de ADN. El plásmido de expresión para la producción de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 06 se puede preparar como sigue:

45 el plásmido 4980 (4980-pBRori-URA3-LACI-SAC) es un plásmido de expresión para la expresión de estreptavidina de núcleo en *E. coli*. Se generó mediante fijación del fragmento del vector EcoRI/CeIII de 3142 pb de longitud derivado del plásmido 1966 (1966-pBRori-URA3-LACI-T-repetición, que se informa en el documento EP-B 1 422 237) con una estreptavidina de núcleo de 435 pb de longitud que codifica el fragmento EcoRI/CeIII.

El plásmido de expresión en *E. coli* para estreptavidina de núcleo comprende los siguientes elementos:

- 50 - el origen de replicación del vector pBR322 para su replicación en *E. coli* (correspondiente a la posición de pb 2517-3160 de acuerdo con Sutcliffe, G., *et al.*, Quant. Biol. 43 (1979) 77-90),
- 55 - el gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (Rose, M. *et al.* Gene 29 (1984) 113-124) que permite la selección de plásmidos mediante complementación de cepas mutantes ΔpyrF de *E. coli* (auxotrofia para uracilo),
- el casete de expresión de estreptavidina de núcleo que comprende
 - 60 - el promotor híbrido T5 (promotor híbrido T5-PN25/03/04 de acuerdo con Bujard, H., *et al.*, Methods Enzymol. 155 (1987) 416-433 y Stueber, D., *et al.*, Immunol. Methods IV (1990) 121-152), que incluye un sitio de unión al ribosoma sintético de acuerdo con Stueber, D., *et al.* (véase anteriormente),
 - el gen estreptavidina de núcleo,
 - 65 - dos finalizadores de la transcripción derivados de bacteriófagos, el finalizador λ-T0 (Schwarz, E., *et al.*

Nature 272 (1978) 410-414) y el finalizador fd (Beck E. y Zink, B. Gene 1-3 (1981) 35-58),

- el gen represor *lacI* de *E. coli* (Farabaugh, P.J., Nature 274 (1978) 765-769).

5 El plásmido de expresión final 5836 para la expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I acortada se puede preparar cortando el gen estructural estreptavidina de núcleo del plásmido 4980 usando el sitio de escisión para las endonucleasas de restricción EcoRI y CeuI flanqueante único e insertando el ácido nucleico flanqueado por el sitio de restricción para EcoRI/CeuI que codifica la proteína de fusión en el fragmento del plásmido EcoRI/CeuI-1 de 3142 pb de longitud.

10

d) Plásmido 3036

15 El plásmido de expresión 3036 para la producción recombinante de proteasa de IgA se basa en el vector OripBR-URA3-EK-IFN (véase, por ejemplo, el documento US 6.291.245). El plásmido 3036 difiere del OripBR-URA3-EK-IFN en la presencia de un gen represor *lacI* y el gen diana que codifica la proteína proteasa de IgA. El gen represor *lacI* se derivó del plásmido pUHA1 (Stueber, D., *et al.*, en: Immunological Methods IV (1990) 121-152). Se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con el procedimiento descrito por Mullis, K.B. y Faloona, F.A. (Methods Enzymology 155 (1987) 335-350) y se clonó en el precursor del plásmido 3036. El gen diana que codifica la proteína proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae* se generó mediante PCR y se clonó en el vector de expresión.

20

El plásmido 3036 de expresión para proteasa de IgA comprende los siguientes elementos:

25 - el origen de replicación del vector pBR322 para su replicación en *E. coli* (correspondiente a la posición de pb 2517-3160 de acuerdo con Sutcliffe, G., *et al.*, Quant. Biol. 43 (1979) 77-90),

25

- el gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (Rose, M. *et al.* Gene 29 (1984) 113-124) que permite la selección de plásmidos mediante complementación de cepas mutantes Δ pyrF de *E. coli* (auxotrofia para uracilo),

30

- el casete de expresión de proteasa de IgA que comprende

35 - el promotor híbrido T5 (promotor híbrido T5-PN25/03/04 de acuerdo con Bujard, H., *et al.*, Methods. Enzymol. 155 (1987) 416-433 y Stueber, D., *et al.*, Immunol. Methods IV (1990) 121-152), que incluye un sitio de unión al ribosoma sintético de acuerdo con Stueber, D., *et al.* (véase anteriormente),

35

- marco abierto de lectura de proteasa de IgA (*Neisseria gonorrhoeae*, n.º de acceso a GenBank P09790),

40

- dos finalizadores de la transcripción derivados de bacteriófagos, el finalizador λ -T0 (Schwarz, E., *et al.* Nature 272 (1978) 410-414) y el finalizador fd (Beck E. y Zink, B. Gene 1-3 (1981) 35-58),

40

- el gen represor *lacI* de *E. coli* (Farabaugh, P.J., Nature 274 (1978) 765-769).

Ejemplo 3

45

Expresión de un polipéptido de fusión mediante cultivo en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente que se ha enriquecido con los aminoácidos leucina y prolina que complementan las auxotrofias

50 Para la expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I como se informa en el documento WO 2012/028526, se empleó un sistema huésped/vector de *E. coli*, que posibilita una selección de plásmidos libre de antibióticos mediante complementación de una auxotrofia en *E. coli* (*pyrF*) (véanse los documentos EP 0 972 838 y US 6.291.245).

50

55 Las cepas CSPZ-2 (*leuB*, *proC*, *trpE*, *thi-1*, Δ *pyrF*) y CSPZ-6 (*thi-1*, Δ *pyrF*) de *E. coli* K12 se transformaron mediante electroporación con el plásmido de expresión 5816 (véase el ejemplo 2). Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 μ l de cultivo con 1000 μ l de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

60

La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

65 **Precultivo:**

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

- 5 1,0 g/l de NH_4Cl , 18,3 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína $\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-isoleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina $\cdot\text{HCl}$, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g/l de glucosa $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 17,5 mg/l de tiamina $\cdot\text{HCl}$.
- 10 La solución de oligoelementos contiene 1,28 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,70 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,30 g/l de H_3BO_3 , 0,18 g/l de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/l de EDTA.

- 15 Para el precultivo, se inocularon 300 ml de MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 0,9 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 9 horas a 37 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 7-13. A continuación, se transfirieron 100 g de este precultivo al biorreactor de 10 l para inocular el medio por lotes.

Fermentación con los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 1 y experimento n.º 2):

- 20 Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania), se usó el siguiente medio por lotes: 4,73 g/l de KH_2PO_4 , 7,47 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 14,94 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2,07 g/l de citrato, 1,22 g/l de L-metionina, 4,08 g/l de L-prolina, 2,57 g/l de L-leucina, 0,08 g/l de citrato de amonio férrico, 0,82 g/l de NaHCO_3 , 7,3 ml/l de solución de oligoelementos, 1,42 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20,9 mg/l de tiamina $\cdot\text{HCl}$, 29,3 g/l de glucosa $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg/l de biotina, 1,2 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10 %.

- 25 La solución de oligoelementos contiene 10 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,13 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,42 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,50 g/l de H_3BO_3 , 2,0 g/l de tiamina-HCl solubilizada en solución de HCl 1 N.

- 30 La solución de alimentación 1 contenía 700 g/l de glucosa $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 8,43 g/l de KH_2PO_4 y 22,38 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

La alimentación 2 comprende 585 g/l de L-prolina y 150,3 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

- 35 Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

La solución alcalina para la regulación del pH era una solución acuosa de NH_3 al 12,5 % (p/v) enriquecida con 11,25 g/l de L-metionina, 51,5 g/l de L-prolina y 56,25 g/l de L-leucina (véase el documento WO 2012/028522).

- 40 Comenzando con 4,2 l de medio por lotes estéril más 100 ml de inóculo del precultivo, se realizó la fermentación por lotes a 37 °C, pH $6,9 \pm 0,2$, 800 mbar de contrapresión y una tasa de oxigenación inicial de 10 l/min. El valor relativo del oxígeno disuelto (pO_2) se mantuvo al 50 % durante toda la fermentación incrementando la velocidad del agitador hasta 1500 rpm. Después de que se agotara la glucosa enriquecida inicialmente, indicado mediante un incremento pronunciado de los valores de oxígeno disuelto, se cambió la temperatura a 25 °C y 15 minutos más tarde la fermentación entró en el modo de lote alimentado con el comienzo de ambas alimentaciones (50 y 13 g/h respectivamente). La tasa de la alimentación 2 se mantiene constante, mientras que la tasa de la alimentación 1 se incrementa gradualmente con un perfil de alimentación predefinido desde 50 a finalmente 160 g/h en 8,5 horas. Cuando la concentración del gas generado de dióxido de carbono se niveló por encima de un 2 %, la tasa de oxigenación se incrementó constantemente desde 10 a 20 l/min en 5 horas. La expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-1 recombinante se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de 150.

- 50 Al final de la fermentación, la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-1 expresada soluble en el citoplasma se transfirió a agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión, con una etapa de calentamiento en la que todo el caldo de cultivo en el fermentador se calienta a 50 °C durante 1 hora antes de su extracción (véase, por ejemplo, el documento EP-B 1 486 571). Luego, se centrifugó el contenido del fermentador con una centrifugadora de flujo pasante (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa extraída se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento posterior. Las proteínas de fusión tetranectina-apolipoproteína A-1 sintetizadas se encontraron exclusivamente en la fracción de restos celulares insoluble en forma de agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI).

60 Análisis de formación de producto:

- 65 Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células ($\text{DO}_{\text{diana}} = 5$) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 μl de cada suspensión (15.000 rpm, 5

minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 300 µl y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 400 µl de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 minutos a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 µl de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 µl de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 µl, 0,6 µl y 0,9 µl) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,1 µg/µl).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió a un dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de regresión lineal con un coeficiente de >0,99 y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

La actividad de la TN-ApoA1 purificada y lipidada se midió en un ensayo de descarga radioactiva de ocho días. Se diferenciaron las células (THP-1) mediante PMA (miristato-acetato de forbol) a macrófagos. Estas células se cargaron con colesterol marcado con ³H y LDL acetiladas. El sobrenadante se desechó y las células se incubaron durante 5 horas con medio de equilibrio para eliminar el colesterol no unido específicamente. Se añadió la TN-ApoA1 lipidada, lo que posibilitó la salida del colesterol marcado con ³H fuera de las células durante las siguientes 18 horas. Se midió la radioactividad en el sobrenadante y en el lisado celular.

Resultados:

El procedimiento de fermentación mencionado anteriormente se usó para expresar tetranectina-apolipoproteína A-1 en la cepa CSPZ-2 original que es auxótrofa frente a

L-leucina y L-prolina y en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofías. A pesar de que esta última cepa ya no necesita la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina, se sometió a prueba el rendimiento de esta cepa con supresión de auxotrofías con el medio de fermentación enriquecido para la comparación directa del rendimiento con la cepa CSPZ-2.

La cepa con supresión de auxotrofías crece más rápido que la cepa original a pesar de que se usó el mismo medio y procedimiento de fermentación (véase la figura 1).

La cepa con supresión de auxotrofías se expresa con más producto más rápido que la cepa original a pesar de que se usó el mismo medio y procedimiento de fermentación (véase la figura 2).

Como se puede ver a partir de las tendencias de la concentración de los aminoácidos leucina y prolina (véase la figura 3 A y B), la cepa con supresión de auxotrofías ahora puede metabolizar L-leucina y L-prolina debido a las vías metabólicas inalteradas. Por lo tanto, el crecimiento de la cepa con supresión de auxotrofías es más rápido en condiciones de cultivo limitado por glucosa del procedimiento por lote alimentado aplicado.

Sorprendentemente, la cepa con supresión de auxotrofías tuvo un rendimiento significativamente mejor que la cepa original en el mismo medio de fermentación definido químicamente enriquecido con los aminoácidos L-leucina y L-prolina. El crecimiento se acelera debido a la posibilidad de metabolizar los aminoácidos contenidos y esto también puede mejorar la formación de producto. La conclusión de esto es el uso de una cepa de producción de *E. coli* protótrofa.

Ejemplo 4

Expresión de proteasa de IgA mediante cultivo en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente que se ha enriquecido con los aminoácidos leucina y prolina que complementan las auxotrofías

Para la expresión de proteasa de IgA (106 kDa), se empleó el sistema huésped/vector de *E. coli*, que posibilita una selección de plásmidos libre de antibióticos mediante complementación de una auxotrofia en *E. coli* (pyrF) (véanse los documentos EP 0 972 838 y US 6.291.245).

Las cepas CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, thi-1, ΔpyrF) y CSPZ-6 (thi-1, ΔpyrF) de *E. coli* K12 se transformaron mediante electroporación con el plásmido de expresión 3036. Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 µl de cultivo con 1000 µl de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo. La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

Precultivo:

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

1,0 g/l de NH₄Cl, 18,3 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina*H₂O, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína*HCl*H₂O, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-isoleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina*HCl, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato*H₂O, 6,0 g/l de glucosa*H₂O, 0,5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de MgSO₄*7H₂O, 17,5 mg/l de tiamina*HCl.

La solución de oligoelementos contiene 10,0 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O disuelto en HCl 0,5 M.

Para el precultivo, se inocularon 220 ml de MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 1,0 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 9 horas a 37 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 11-13. El volumen de inóculo se calculó con $V_{inoc.} = 100 \text{ ml} * 5 / DO_{PC}$ y depende de la densidad óptica del precultivo para inocular el medio por lotes del biorreactor de 10 l con una cantidad equivalente de células.

Fermentación con los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 3 y experimento n.º 4):

Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania) se realizó el mismo procedimiento que como se describe en el ejemplo 3, excepto en que no se realizó ninguna etapa de calentamiento al final de las fermentaciones.

Análisis de formación de producto:

Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células ($DO_{diana} = 10$) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 µl de cada suspensión (15.000 rpm, 5 minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 100 µl y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 200 µl de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 min a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 µl de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 µl de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 µl, 0,6 µl y 0,9 µl) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,1 µg/µl).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió al dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de regresión lineal con un coeficiente de $>0,99$ y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

Resultados:

El procedimiento de fermentación mencionado anteriormente se usó para expresar la proteasa de IgA en la cepa CSPZ-2 original que es auxótrofa frente a L-leucina y L-prolina y en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias. A pesar de que esta última cepa ya no necesita la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina, se ha sometido a prueba el rendimiento de esta cepa con supresión de auxotrofias en el medio de fermentación enriquecido para la comparación directa del rendimiento con la cepa CSPZ-2 original.

El crecimiento de la cepa con supresión de auxotrofias en medio por lotes enriquecido con aminoácidos fue significativamente más rápido en comparación con la cepa original.

Ejemplo 5**Cultivo de una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias y de la cepa MG1655 natural en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente**

Un claro beneficio de una cepa con supresión de auxotrofias es que no se necesita alimentar más aminoácidos

costosos durante el cultivo en un medio definido químicamente debido al fenotipo protótrofo. Esto reduciría drásticamente los costes de los productos para el procedimiento. Para someter a prueba, se realizó una fermentación idéntica con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias en la que simplemente se excluyeron los aminoácidos L-leucina y L-prolina del medio y alimentaciones. Para demostrar que la cepa con supresión de auxotrofias tiene ventajas significativas frente a una cepa de *E. coli* natural que también sea protótrofa, se exploraron el crecimiento y la formación de producto de la cepa MG 1655 de K12 (con el gen *pyrF* delecionado para ajustarse al sistema de selección libre de antibióticos) en el mismo procedimiento de fermentación.

Las cepas CSPZ-6 (*thi-1*, $\Delta pyrF$) y derivado de MG1655 ($\Delta pyrF$, $\Delta ompT$) de *E. coli* K12 se transformaron mediante electroporación con el plásmido de expresión 5816 (véase el ejemplo 2). Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 μ l de cultivo con 1000 μ l de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

Precultivo:

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

1,0 g/l de NH_4Cl , 18,3 g/l de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina $\cdot H_2O$, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína $\cdot HCl \cdot H_2O$, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-soleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina $\cdot HCl$, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato $\cdot H_2O$, 5,0 g/l de glucosa $\cdot H_2O$, 5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 17,5 mg/l de tiamina $\cdot HCl$.

La solución de oligoelementos contiene 1,28 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1,70 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,30 g/l de H_3BO_3 , 0,18 g/l de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0,25 g/l de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,22 g/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,75 g/l de EDTA.

Para el precultivo, se inocularon 300 ml de medio MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 0,9 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 9 horas a 37 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 6-13. A continuación, se transfirieron 100 g de este precultivo al biorreactor de 10 l para inocular el medio por lotes.

Fermentación sin los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 5 y experimento n.º 6):

Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania), se usó el siguiente medio por lotes: 4,73 g/l de KH_2PO_4 , 7,47 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$, 14,94 g/l de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,07 g/l de citrato, 1,22 g/l de L-metionina, 0,08 g/l de citrato de amonio férrico, 0,82 g/l de $NaHCO_3$, 7,3 ml/l de solución de oligoelementos, 1,42 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20,9 mg/l de tiamina $\cdot HCl$, 29,3 g/l de glucosa $\cdot H_2O$, 0,2 mg/l de biotina, 1,2 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10 %.

La solución de oligoelementos contiene 10 g/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,25 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,13 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1,0 g/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,42 g/l de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,3 g/l de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0,50 g/l de H_3BO_3 , 2,0 g/l de tiamina-HCl solubilizada en solución de HCl 1 N.

La solución de alimentación 1 contenía 700 g/l de glucosa $\cdot H_2O$, 8,43 g/l de KH_2PO_4 y 22,38 g/l de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.

La alimentación 2 comprende solo 150,3 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

La solución alcalina para la regulación del pH era una solución acuosa de NH_3 al 12,5 % (p/v) enriquecida con 11,25 g/l de L-metionina.

Comenzando con 4,2 l de medio por lotes estéril más 100 ml de inóculo del precultivo, se realizó la fermentación por lotes a 37 °C, pH 6,9 \pm 0,2, 800 mbar de contrapresión y una tasa de oxigenación inicial de 10 l/min. El valor relativo del oxígeno disuelto (pO_2) se mantuvo al 50 % durante toda la fermentación incrementando la velocidad del agitador hasta 1500 rpm. Después de que se agotara la glucosa enriquecida inicialmente, indicado mediante un incremento pronunciado de los valores de oxígeno disuelto, se cambió la temperatura a 25 °C y 15 minutos más tarde la fermentación entró en el modo de lote alimentado con el comienzo de ambas alimentaciones (50 y 13 g/h respectivamente). La tasa de la alimentación 2 se mantiene constante, mientras que la tasa de la alimentación 1 se incrementa gradualmente con un perfil de alimentación predefinido desde 50 a finalmente 160 g/h en 8,5 horas.

Cuando la concentración del gas generado de dióxido de carbono se niveló por encima de un 2 %, la tasa de oxigenación se incrementó constantemente desde 10 a 20 l/min en 5 horas. La expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-1 recombinante se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de 150. Al final de la fermentación, la tetranectina-apolipoproteína A-I expresada soluble en el citoplasma se transfiere a agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión, con una etapa de calentamiento en la que todo el caldo de cultivo en el fermentador se calienta a 50 °C durante una hora antes de su extracción (véase, por ejemplo, el documento EP-B 1 486 571). Luego, se centrifugó el contenido del fermentador con una centrifugadora de flujo pasante (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa extraída se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento posterior. Las proteínas de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I sintetizadas se encontraron exclusivamente en la fracción de restos celulares insoluble en forma de agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI).

Análisis de formación de producto:

Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células ($DO_{\text{diana}} = 5$) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 μl de cada suspensión (15.000 rpm, 5 minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 300 μl y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 400 μl de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 minutos a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 μl de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 μl de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 μl , 0,6 μl y 0,9 μl) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió al dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de regresión lineal con un coeficiente de $>0,99$ y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

La actividad de la TN-ApoA1 purificada y lipidada se midió en un ensayo de descarga radioactiva de ocho días. Se diferenciaron las células (THP-1) mediante PMA (miristato-acetato de forbol) a macrófagos. Estas células se cargaron con colesterol marcado con ^3H y LDL acetiladas. El sobrenadante se desechó y las células se incubaron durante 5 horas con medio de equilibrio para eliminar el colesterol no unido específicamente. Se añadió la TN-ApoA1 lipidada, lo que permitió la salida del colesterol marcado con ^3H fuera de las células durante las siguientes 18 horas. Se midió la radioactividad en el sobrenadante y en el lisado celular.

Resultados:

El procedimiento de fermentación mencionado anteriormente se usó para expresar la tetranectina-apolipoproteína A-I en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias y la cepa derivada de MG1655 protótrofa que representa la cepa MG1655 natural de K12. Ambas cepas no necesitan la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina que, consecuentemente, se excluyeron del medio y alimentaciones. Esto claramente reduce el coste de los productos para el procedimiento.

Tanto la cepa con supresión de auxotrofias como la natural crecen más rápido en el medio sin los aminoácidos L-leucina y L-prolina debido a la carencia de efectos inhibidores del crecimiento de concentraciones más altas de L-leucina (véase el ejemplo 3). La densidad óptica final de la cepa con supresión de auxotrofias se mejora mucho en este medio que carece de aminoácidos, mientras que el crecimiento de la cepa natural se reduce significativamente después de la inducción de formación de producto y en la fase tardía de la fermentación (véase la figura 4).

A pesar de que la formación de producto de la cepa con supresión de auxotrofias en las primeras horas después de la adición del inductor es más rápida en el medio de fermentación enriquecido con aminoácidos, el rendimiento final es prácticamente el mismo en comparación con la fermentación sin adición de aminoácidos (véase la figura 5). Por lo tanto, la exclusión de los aminoácidos del medio ahorra costes significativos, pero no reduce los rendimientos de producto. La cepa derivada de MG 1655 de *E. coli* protótrofa natural tiene insuficiencias significativas en los rendimientos de crecimiento y producto.

Sumario:

La cepa con supresión de auxotrofias mostró un mejor rendimiento que una cepa de *E. coli* protótrofa natural en el mismo medio de fermentación definido químicamente, incluso si no se enriquece con los aminoácidos L-leucina y L-prolina. Por lo tanto, es ventajoso suprimir en cepas de *E. coli* de alta producción sus auxotrofias para aminoácidos a

fin de permitir un cultivo en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y aprovechar las ventajas de usar dicho medio mínimo de crecimiento definido químicamente en lugar de usar una cepa de *E. coli* protótrofa natural como MG1655 o la estrechamente relacionada W3110 (Vijayendran, C., *et al.*, J. Biotechnol. 128 (2007) 747-761) como se puede ver adicionalmente en el ejemplo 6.

Ejemplo 6

Cultivo de una cepa de *E. coli* con supresión de auxotrofias y de la cepa W3110 natural en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente

Para demostrar que la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias tiene ventajas significativas frente a la cepa W3110 de *E. coli* protótrofa natural (con el gen *pyrF* deletado para ajustarse al sistema de selección libre de antibióticos), se exploraron el crecimiento y la formación de producto en el mismo procedimiento de fermentación.

Las cepas CSPZ-6 (*thi-1*, Δ *pyrF*) y 66C5 (= derivado Δ *pyrF* de W3110) de *E. coli* K12 se transformaron mediante electroporación con el plásmido de expresión 5830 (véase el ejemplo 2). Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 μ l de cultivo con 1000 ml de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

Precultivo:

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

1,0 g/l de NH₄Cl, 18,3 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina*H₂O, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína*HCl*H₂O, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-isoleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina*HCl, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato*H₂O, 5,0 g/l de glucosa*H₂O, 5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de MgSO₄*7H₂O, 17,5 mg/l de tiamina*HCl.

La solución de oligoelementos contiene 10,0 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O disuelto en HCl 0,5 M.

Para la prefermentación, se inocularon 300 ml de medio MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 0,9 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 8 horas a 32 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 4-9. El volumen de inóculo se calculó con $V_{inoc.} = 100 \text{ ml} * 5 / DO_{PC}$ y depende de la densidad óptica del precultivo para inocular el medio por lotes del biorreactor de 10 l con una cantidad equivalente de células.

Fermentación sin los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 7 y experimento n.º 8):

Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania), se usó el siguiente medio por lotes: 1,58 g/l de KH₂PO₄, 7,47 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 13,32 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 2,07 g/l de citrato, 1,22 g/l de L-metionina, 0,82 g/l de NaHCO₃, 7,3 ml/l de solución de oligoelementos, 0,99 g/l de MgSO₄*7H₂O, 20,9 mg/l de tiamina*HCl, 29,3 g/l de glucosa*H₂O, 0,2 mg/l de biotina, 1,2 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10 %.

La solución de oligoelementos contiene 10 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃ solubilizado en solución de HCl 0,5 M.

La solución de alimentación 1 contenía 700 g/l de glucosa*H₂O, 12,3 g/l de MgSO₄*7H₂O y 0,1 g/l de FeSO₄*7H₂O.

La alimentación 2 comprende 52,7 g/l de KH₂PO₄, 139,9 g/l de K₂HPO₄*3H₂O y 132,1 g/l de (NH₄)₂HPO₄.

Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

La solución alcalina para la regulación del pH era una solución acuosa de NH₃ al 12,5 % (p/v) enriquecida con 11,25 g/l de L-metionina.

Comenzando con 4,2 l de medio por lotes estéril más 100 ml de inóculo del precultivo, se realizó la fermentación por lotes a 31 °C, pH 6,9 ± 0,2, 800 mbar de contrapresión y una tasa de oxigenación inicial de 10 l/min. El valor relativo del oxígeno disuelto (pO₂) se mantuvo al 50 % durante toda la fermentación incrementando la velocidad del agitador hasta 1500 rpm. Después de que se agotara la glucosa enriquecida inicialmente, indicado mediante un incremento pronunciado de los valores de oxígeno disuelto, se cambió la temperatura a 25 °C y 15 minutos más tarde la fermentación entró en el modo de lote alimentado con el comienzo de ambas alimentaciones (60 y 14 g/h respectivamente). La tasa de la alimentación 2 se mantiene constante, mientras que la tasa de la alimentación 1 se incrementa gradualmente con un perfil de alimentación predefinido desde 60 a finalmente 160 g/h en 7 horas. Cuando la concentración del gas generado de dióxido de carbono se niveló por encima de un 2 %, la tasa de oxigenación se incrementó constantemente desde 10 a 20 l/min en 5 horas. La expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I recombinante se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de 120. Al final de la fermentación, la tetranectina-apolipoproteína A-I expresada soluble en el citoplasma se transfiere a agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión, con una etapa de calentamiento en la que todo el caldo de cultivo en el fermentador se calienta a 50 °C durante 1 hora antes de su extracción (véase, por ejemplo, el documento EP-B 1 486 571). Luego, se centrifugó el contenido del fermentador con una centrifugadora de flujo pasante (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa extraída se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento posterior. Las proteínas de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I sintetizadas se encontraron exclusivamente en la fracción de restos celulares insoluble en forma de agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI).

Análisis de formación de producto:

Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células (DO_{diana} = 5) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 µl de cada suspensión (15.000 rpm, 5 minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 300 µl y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 400 µl de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 minutos a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 µl de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 µl de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 µl, 0,6 µl y 0,9 µl) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,1 µg/µl).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió al dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de regresión lineal con un coeficiente de >0,99 y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

La actividad de la TN-ApoA1 purificada y lipidada se midió en un ensayo de descarga radioactiva de ocho días. Se diferenciaron las células (THP-1) mediante PMA (miristato-acetato de forbol) a macrófagos. Estas células se cargaron con colesterol marcado con ³H y LDL acetiladas. El sobrenadante se desechó y las células se incubaron durante 5 horas con medio de equilibrio para eliminar el colesterol no unido específicamente. Se añadió la TN-ApoA1 lipidada, lo que posibilitó la salida del colesterol marcado con ³H fuera de las células durante las siguientes 18 horas. Se midió la radioactividad en el sobrenadante y en el lisado celular.

Resultados:

Se usó el procedimiento de fermentación mencionado anteriormente para expresar la tetranectina-apolipoproteína A-I en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias y la cepa 66C5 protótrofa que representa la cepa W3110 natural de K12. Ambas cepas no necesitan la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina que, consecuentemente, se excluyeron del medio y alimentaciones. Esto reduce el coste de los productos para el procedimiento.

Sorprendentemente, la cepa 66C5 natural, a pesar de ser protótrofa e inoculada con una cantidad equivalente de células, creció de manera extremadamente lenta desde el comienzo en comparación con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias en el mismo medio definido químicamente y en las mismas condiciones de cultivo (véase la figura 6). Como consecuencia, las tasas de alimentación de glucosa se tuvieron que adaptar para evitar la sobrealimentación y acumulación de glucosa en el medio. Además, las densidades ópticas finales difieren en gran medida entre ambas cepas. Mientras que la cepa con supresión de auxotrofias alcanzó más de 300, la cepa natural solo obtuvo 143, y la fermentación se finalizó debido al estancamiento del crecimiento. Se repitió la fermentación con la cepa 66C5 con temperaturas elevadas (experimento n.º 9) para la fase de lotes (37 °C) y para la fase de lote alimentado (30 °C), pero el rendimiento de crecimiento no se pudo mejorar mucho (véase la figura 7).

Debido a que el crecimiento de la cepa 66C5 natural estaba muy por debajo del crecimiento de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias cuando se cultivó en el mismo medio definido químicamente y en las mismas condiciones, la formación de producto también fue mucho más baja (véase la figura 8). Mientras que la cepa con supresión de auxotrofias obtuvo finalmente 22,6 g/l después de 31 horas de expresión, la fermentación de la cepa 66C5 natural se finalizó después de 38 horas de cultivo debido al estancamiento del crecimiento y, consecuentemente, el rendimiento de producto se cuantificó solo a 2,3 g/l. Además, la productividad específica fue más baja (21,9 mg/DO frente a 71,1 mg/DO). Se repitió la fermentación con la cepa 66C5 natural con temperaturas elevadas para la fase de lotes (37 °C) y para la fase de lote alimentado (30 °C), pero el rendimiento de producto solo se pudo mejorar a 6,9 g/l (véase la figura 9). La cepa de *E. coli* protótrofa natural tiene insuficiencias significativas en comparación directa con la cepa con supresión de auxotrofias.

Sumario:

La cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias tuvo un rendimiento mucho mejor que un derivado de la cepa W3110 de *E. coli* protótrofa natural en el mismo medio de fermentación definido químicamente sin el enriquecimiento con otros aminoácidos salvo metionina. Por lo tanto, es ventajoso suprimir en cepas de *E. coli* sus auxotrofias para aminoácidos a fin de usar un medio mínimo definido químicamente para su cultivo y aprovechar las ventajas de usar dicho medio en lugar de usar una cepa de *E. coli* protótrofa natural, tal como, por ejemplo, MG 1655 o W3110.

Ejemplo 7

Cultivo de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias y del derivado Δ pyrF de la cepa BL21 protótrofa natural en un medio definido químicamente

Para demostrar que la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias tiene ventajas significativas frente a la cepa BL21 de *E. coli* B protótrofa natural (con el gen pyrF deletado para ajustarse al sistema de selección libre de antibióticos, denominado CSPZ-14), se han explorado el crecimiento y la formación de producto en el mismo procedimiento de fermentación.

La cepa CSPZ-6 (thi-1, Δ pyrF) de *E. coli* K12 y la cepa CSPZ-14 (= derivado Δ pyrF de BL21) de *E. coli* B se transformaron mediante electroporación con el plásmido n.º 5836 (véase el ejemplo 2) para expresar un derivado de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I acortada. Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 μ l de cultivo con 1000 μ l de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo. La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

Precultivo:

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

1,0 g/l de NH₄Cl, 18,3 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina*H₂O, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína*HCl*H₂O, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-isoleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina*HCl, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato*H₂O, 6,0 g/l de glucosa*H₂O, 0,5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de MgSO₄*7H₂O, 17,5 mg/l de tiamina*HCl.

La solución de oligoelementos contiene 10,0 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O disuelto en HCl 0,5 M.

Para el precultivo, se inocularon 300 ml de MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 0,9 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 8 horas a 32 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 4-9. A continuación, se transfirieron 100 g de este precultivo al biorreactor de 10 l para inocular el medio por lotes.

Fermentación sin los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 10 y experimento n.º 11):

Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania), se usó el siguiente medio por lotes:

1,58 g/l de KH₂PO₄, 7,47 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 13,32 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 2,07 g/l de citrato, 1,22 g/l de L-metionina, 0,82 g/l de NaHCO₃, 7,3 ml/l de solución de oligoelementos, 0,99 g/l de MgSO₄*7H₂O, 20,9 mg/l de tiamina*HCl,

29,3 g/l de glucosa*H₂O, 0,2 mg/l de biotina, 1,2 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10 %.

La solución de oligoelementos contiene 10 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃ solubilizado en solución de HCl 0,5 M.

La solución de alimentación 1 contenía 700 g/l de glucosa*H₂O, 7,4 g/l de MgSO₄*7H₂O y 0,1 g/l de FeSO₄*7H₂O.

La alimentación 2 comprende 52,7 g/l de KH₂PO₄, 139,9 g/l de K₂HPO₄*3H₂O y 66,0 g/l de (NH₄)₂HPO₄.

Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

La solución alcalina para la regulación del pH era una solución acuosa de NH₃ al 12,5 % (p/v) enriquecida con 11,25 g/l de L-metionina.

Comenzando con 4,2 l de medio por lotes estéril más 100 ml de inóculo del precultivo, se realizó la fermentación por lotes a 31 °C, pH 6,9 ± 0,2, 800 mbar de contrapresión y una tasa de oxigenación inicial de 10 l/min. El valor relativo del oxígeno disuelto (pO₂) se mantuvo al 50 % durante toda la fermentación incrementando la velocidad del agitador hasta 1500 rpm. Después de que se agotara la glucosa enriquecida inicialmente, indicado mediante un incremento pronunciado de los valores de oxígeno disuelto, se cambió la temperatura a 25 °C y 15 minutos más tarde la fermentación entró en el modo de lote alimentado con el comienzo de ambas alimentaciones (60 y 14 g/h respectivamente). La tasa de la alimentación 2 se mantiene constante, mientras que la tasa de la alimentación 1 se incrementa gradualmente con un perfil de alimentación predefinido desde 60 a finalmente 160 g/h en 7 horas. Cuando la concentración del gas generado de dióxido de carbono se niveló por encima de un 2 %, la tasa de oxigenación se incrementó constantemente desde 10 a 20 l/min en 5 horas. La expresión de la proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I recombinante se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de aprox. 150. Al final de la fermentación, la tetranectina-apolipoproteína A-I expresada soluble en el citoplasma se transfiere a agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión, con una etapa de calentamiento en la que todo el caldo de cultivo en el fermentador se calienta a 50 °C durante 1 hora antes de su extracción (véase, por ejemplo, el documento EP-B 1 486 571). Luego, se centrifugó el contenido del fermentador con una centrifugadora de flujo pasante (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa extraída se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento posterior. Las proteínas de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I sintetizadas se encontraron exclusivamente en la fracción de restos celulares insoluble en forma de agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI).

Análisis de formación de producto:

Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células (DO_{diana} = 5) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 µl de cada suspensión (15.000 rpm, 5 minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 300 µl y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 400 µl de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 minutos a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 µl de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 µl de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 µl, 0,6 µl y 0,9 µl) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,1 µg/µl).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió al dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de regresión lineal con un coeficiente de >0,99 y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

La actividad de la TN-ApoA1 acortada purificada y lipidada se midió en un ensayo de descarga radioactiva de ocho días. Se diferenciaron las células (THP-1) mediante PMA (miristato-acetato de forbol) a macrófagos. Estas células se cargaron con colesterol marcado con ³H y LDL acetiladas. El sobrenadante se desechó y las células se incubaron durante 5 horas con medio de equilibrio para eliminar el colesterol no unido específicamente. Se añadió la TN-ApoA1 acortada lipidada, lo que posibilitó la salida del colesterol marcado con ³H fuera de las células durante las siguientes 18 horas. Se midió la radioactividad en el sobrenadante y en el lisado celular.

Resultados:

Se usó el procedimiento de fermentación mencionado anteriormente para expresar una proteína de fusión

tetranectina-apolipoproteína A-I acortada en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias y en la cepa CSPZ-14 protótrofa que representa la cepa BL21 natural de *E. coli* B. Ambas cepas no necesitan la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina que, consecuentemente, se excluyeron del medio y alimentaciones. Esto reduce el coste de los productos para el procedimiento.

Sorprendentemente, la cepa natural y CSPZ-14 derivada de BL21, a pesar de ser protótrofas y de que en la fermentación se inocularon con una cantidad equivalente de células, crecieron significativamente de manera más lenta desde el comienzo en comparación con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias en el mismo medio definido químicamente y en las mismas condiciones de cultivo (véase la figura 10). Como consecuencia, la alimentación de glucosa comenzó 1,2 horas más tarde, pero el incremento de la tasa de alimentación siguió el mismo perfil que en la fermentación comparativa. Las densidades ópticas finales difieren en gran medida entre ambas cepas. Mientras que la cepa con supresión de auxotrofias alcanzó una densidad óptica de 266 antes de la etapa de calentamiento final, la densidad óptica de la cepa natural disminuyó desde un máximo a las 33 horas a solo 143 al final de la fermentación (47 horas).

La formación de producto se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de aprox. 150 en ambos cultivos. Debido al crecimiento reducido de la cepa CSPZ-14, se alcanzó esta DO a las 22,2 horas en comparación con las 19,5 horas con la cepa CSPZ-6 cuando se cultivó en el mismo medio definido químicamente y en las mismas condiciones. A pesar de esto, la tasa de formación de producto de CSPZ-14, fue significativamente más baja y, por lo tanto, el rendimiento final alcanzó solo 9,6 g/l después de 23 horas de expresión (véase la figura 11). En comparación con esto, la cepa con supresión de auxotrofias produjo 33,8 g/l de proteína de fusión después de 24 horas de expresión inducida. Además, la productividad específica fue más baja (67,1 mg/DO frente a 135,7 mg/DO). La cepa de *E. coli* protótrofa natural tiene carencias significativas en comparación directa con la cepa con supresión de auxotrofias.

Sumario:

La cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias tuvo un rendimiento mucho mejor que una cepa CSPZ-14 de *E. coli* protótrofa natural (derivado Δ pyrF de BL21) en el mismo medio de fermentación definido químicamente sin el enriquecimiento con otros aminoácidos salvo metionina. Por lo tanto, es ventajoso suprimir en cepas de *E. coli* sus auxotrofias para aminoácidos a fin de cultivarlas en un medio mínimo definido químicamente y aprovechar las ventajas de usar dicho medio en lugar de usar una cepa de *E. coli* protótrofa natural, tal como, por ejemplo, MG1655, W3110 o BL21.

Ejemplo 8

Cultivo de la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias y de la cepa MG1655 protótrofa natural en un medio definido químicamente

Para demostrar que la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofias tiene ventajas significativas frente a la cepa MG1655 de *E. coli* K12 protótrofa natural (con el gen pyrF deletado para ajustarse al sistema de selección libre de antibióticos, denominado CSPZ-9), se han explorado el crecimiento y la formación de producto de proteasa de IgA en el mismo procedimiento de fermentación entre las dos cepas.

Las cepas CSPZ-6 (*thi-1*, Δ pyrF) y CSPZ-9 (= derivado Δ pyrF de MG1655) de *E. coli* K12 se transformaron mediante electroporación con el plásmido 3036 para expresar la proteasa de IgA. Las células de *E. coli* transformadas se hicieron crecer en primer lugar a 37 °C en placas de agar. Una colonia obtenida a partir de esta placa se transfirió a un cultivo en frasco rodante de 3 ml y se hizo crecer a 37 °C a una densidad óptica de 1-2 (medida a 578 nm). A continuación, se mezclaron 1000 μ l de cultivo con 1000 μ l de glicerol estéril al 86 % y se congelaron inmediatamente a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo. La expresión correcta del producto de este clon se verificó en primer lugar en experimentos con matraces de agitación a pequeña escala y se analizó con SDS-PAGE antes de la transferencia al fermentador de 10 l.

Precultivo:

Para el precultivo se ha usado un medio definido químicamente (MDQ):

1,0 g/l de NH₄Cl, 18,3 g/l de K₂HPO₄*3H₂O, 1,6 g/l de citrato, 0,78 g/l de glicina, 0,29 g/l de L-alanina, 0,41 g/l de L-arginina, 0,37 g/l de L-asparagina*H₂O, 0,05 g/l de L-aspartato, 0,05 g/l de L-cisteína*HCl*H₂O, 0,05 g/l de L-histidina, 0,31 g/l de L-isoleucina, 0,38 g/l de L-leucina, 0,40 g/l de L-lisina*HCl, 0,27 g/l de L-metionina, 0,43 g/l de L-fenilalanina, 0,36 g/l de L-prolina, 0,15 g/l de L-serina, 0,40 g/l de L-treonina, 0,07 g/l de L-triptófano, 0,33 g/l de L-valina, 0,51 g/l de L-tirosina, 0,12 g/l de L-glutamina, 0,82 g/l de Na-L-glutamato*H₂O, 6,0 g/l de glucosa*H₂O, 0,5 ml/l de solución de oligoelementos, 0,86 g/l de MgSO₄*7H₂O, 17,5 mg/l de tiamina*HCl.

La solución de oligoelementos contiene 10,0 g/l de FeSO₄*7H₂O, 2,25 g/l de ZnSO₄*7H₂O, 2,13 g/l de MnSO₄*H₂O, 0,50 g/l de H₃BO₃, 0,3 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 0,42 g/l de CoCl₂*6H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄*5H₂O disuelto en HCl

0,5 M.

Para el precultivo, se inocularon 220 ml de MDQ en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml con cuatro deflectores con 0,9 ml de una ampolla de un banco de semillas principal. El cultivo se realizó en un agitador rotatorio durante 8 horas a 37 °C y 170 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (578 nm) de 10-12. Para inocular el medio por lotes del biorreactor de 10 l con una cantidad equivalente de células, se calculó el volumen de inóculo con $V_{inoc.} = 100 \text{ ml} * 5 / DO_{PC}$ y, por lo tanto, es dependiente de la densidad óptica del precultivo.

Fermentación sin los aminoácidos L-leucina y L-prolina (experimento n.º 12 y experimento n.º 13):

Para la fermentación en un fermentador Biostat C, DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania), se usó el siguiente medio por lotes:

1,58 g/l de KH_2PO_4 , 7,47 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$, 13,32 g/l de $K_2HPO_4 * 3H_2O$, 2,07 g/l de citrato, 1,22 g/l de L-metionina, 0,82 g/l de $NaHCO_3$, 7,3 ml/l de solución de oligoelementos, 0,99 g/l de $MgSO_4 * 7H_2O$, 20,9 mg/l de tiamina*HCl, 29,3 g/l de glucosa* H_2O , 0,2 mg/l de biotina, 1,2 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10 %.

La solución de oligoelementos contiene 10 g/l de $FeSO_4 * 7H_2O$, 2,25 g/l de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 2,13 g/l de $MnSO_4 * H_2O$, 1,0 g/l de $CuSO_4 * 5H_2O$, 0,42 g/l de $CoCl_2 * 6H_2O$, 0,3 g/l de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} * 4H_2O$, 0,50 g/l de H_3BO_3 solubilizado en solución de HCl 0,5 M.

La solución de alimentación 1 contenía 700 g/l de glucosa* H_2O , 7,4 g/l de $MgSO_4 * 7H_2O$ y 0,1 g/l de $FeSO_4 * 7H_2O$.

La alimentación 2 comprende 52,7 g/l de KH_2PO_4 , 139,9 g/l de $K_2HPO_4 * 3H_2O$ y 66,0 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$.

Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

La solución alcalina para la regulación del pH era una solución acuosa de NH_3 al 12,5 % (p/v) enriquecida con 11,25 g/l de L-metionina.

Comenzando con 4,2 l de medio por lotes estéril más el volumen de inóculo respectivo, se realizó la fermentación por lotes a 31 °C, pH $6,9 \pm 0,2$, 800 mbar de contrapresión y una tasa de oxigenación inicial de 10 l/min. El valor relativo del oxígeno disuelto (pO_2) se mantuvo al 50 % durante toda la fermentación incrementando la velocidad del agitador hasta 1500 rpm. Después de que se agotara la glucosa enriquecida inicialmente, indicado mediante un incremento pronunciado de los valores de oxígeno disuelto, se cambió la temperatura a 25 °C y 15 minutos más tarde la fermentación entró en el modo de lote alimentado con el comienzo de ambas alimentaciones (60 y 14 g/h respectivamente). La tasa de la alimentación 2 se mantiene constante, mientras que la tasa de la alimentación 1 se incrementa gradualmente con un perfil de alimentación predefinido desde 60 a finalmente 160 g/h en 7 horas. Cuando la concentración del gas generado de dióxido de carbono se niveló por encima de un 2 %, la tasa de oxigenación se incrementó constantemente desde 10 a 20 l/min en 5 horas. La expresión de la proteasa de IgA recombinante se indujo mediante la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de aprox. 150. La fermentación se realiza hasta 48 horas a pesar de que no haya una disminución significativa de la densidad óptica. Al final, el caldo de cultivo se enfría a 4-8 °C y se almacena durante la noche en el recipiente del fermentador. Se centrifugó al día siguiente el contenido del fermentador con una centrifugadora de flujo pasante (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa extraída se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento posterior. La proteasa de IgA sintetizada se encuentra exclusivamente en la fracción de restos celulares insoluble en forma de agregados de proteínas insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI).

Análisis de formación de producto:

Las muestras recogidas del fermentador, una antes de la inducción y las demás en puntos de tiempo dedicados después de la inducción de la expresión de proteínas, se analizan con SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de cada muestra, se suspenden la misma cantidad de células ($DO_{diana} = 10$) en 5 ml de tampón PBS y se rompen por medio de sonicación en hielo. A continuación, se centrifugan 100 μ l de cada suspensión (15.000 rpm, 5 minutos) y se retira cada sobrenadante y se transfiere a un frasco separado. Esto es para discriminar entre la proteína diana expresada soluble e insoluble. A cada fracción de sobrenadante (=soluble) se añaden 100 μ l y a cada fracción de sedimento (=insoluble) se añaden 200 μ l de tampón de muestra SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685). Las muestras se calientan durante 15 minutos a 95 °C en intenso mezclado para solubilizar y reducir todas las proteínas en las muestras. Después de enfriar a temperatura ambiente, se transfieren 5 μ l de cada muestra a un gel de poliacrilamida TGX Criterion Stain Free al 4-20 % (Bio-Rad). Adicionalmente, se posicionan en el gel 5 μ l de patrón de peso molecular (patrón Precision Plus Protein, Bio-Rad) y 3 cantidades (0,3 μ l, 0,6 μ l y 0,9 μ l) de patrón de cuantificación con concentración de proteína de producto conocida (0,15 μ g/ μ l).

La electroforesis se efectuó durante 60 min a 200 V y luego el gel se transfirió al dispositivo de formación de imágenes EZ GelDOC (Bio-Rad) y se procesó durante 5 min con radiación UV. Las imágenes del gel se analizaron usando el programa informático de análisis Image Lab (Bio-Rad). Con los tres patrones se calculó una curva de

regresión lineal con un coeficiente de $>0,99$ y a partir de ello se calcularon las concentraciones de proteína diana en la muestra original.

5 La actividad de la proteasa de IgA replegada y purificada se sometió a prueba con la molécula de los polipéptidos de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I como se describe anteriormente, que es un polipéptido precursor a partir del que se liberó el polipéptido de fusión tetranectina-apolipoproteína A-I mediante escisión enzimática *in vitro* usando esta proteasa de IgA. La actividad de escisión estaba en el intervalo esperado.

10 **Resultados:**

10 El procedimiento de fermentación mencionado anteriormente se usó para expresar la proteína proteasa de IgA en la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofías y en la cepa CSPZ-9 protótrofa que representa la cepa MG 1655 natural de *E. coli* K12. Ambas cepas no necesitan la alimentación de los aminoácidos L-leucina y L-prolina que, consecuentemente, se excluyeron del medio y alimentaciones. Esto drásticamente reduce el coste de los productos para el procedimiento.

15 La cepa natural y CSPZ-9 derivada de MG 1655 mostraron un crecimiento más rápido al inicio de la fermentación en comparación con la cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofías en el mismo medio definido químicamente y en las mismas condiciones de cultivo. 24 horas después de la inoculación las densidades ópticas fueron casi las mismas. Pero luego la densidad óptica de ambas cepas fue sorprendentemente diferente. El crecimiento de la cepa CSPZ-9 se había ralentizado significativamente después de 30 horas de cultivo y, como consecuencia de la alimentación continua de la alimentación 1, la concentración de glucosa en el medio se incrementó a 16 g/l. Por lo tanto, la fermentación se finalizó después de 37 horas de cultivo. El análisis de los metabolitos reveló un incremento significativo de las concentraciones de amoníaco, glutamato, hierro, magnesio y acetato en el medio debido a la disminución significativa de la tasa de crecimiento. Las densidades ópticas finales difieren en gran medida entre ambas cepas. Mientras que la cepa con supresión alcanzó 362, la densidad óptica de la cepa natural disminuyó desde un máximo a las 24 horas de 256 a solo 177 al final de la fermentación (37 horas) (véase la figura 12).

20 Después de la inducción de la expresión de proteínas con la adición de 2,4 g de IPTG a una densidad óptica de aprox. 150 se produce significativamente más proteasa de IgA con la cepa CSPZ-6 en comparación con la cepa CSPZ-9 natural (véase la figura 13).

25 **Sumario:**

35 La cepa CSPZ-6 con supresión de auxotrofías mostró características de crecimiento mejoradas en comparación con la cepa CSPZ-9 de *E. coli* protótrofa natural (derivado Δ pyrF de MG1655) en el mismo medio de fermentación definido químicamente sin el enriquecimiento con otros aminoácidos. Por lo tanto, es útil suprimir en cepas de *E. coli* altamente productivas sus auxotrofías para aminoácidos a fin de poder cultivarlas en un medio mínimo definido químicamente y aprovechar las ventajas de usar dicho medio y en lugar de usar un derivado de la cepa de *E. coli* protótrofo natural de MG1655, W3110 o BL21.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Uso de una cepa procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos para la producción recombinante de un polipéptido

<130> 31359

10 <150> EP 13156288.6
<151> 22-02-2013

<160> 6

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
1 5

25 <210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> marcador de hexahistidina

<400> 2

His His His His His His
1 5

35 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro
1 5

40 <210> 4
<211> 283
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A1

<400> 4

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu

ES 2 688 044 T3

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
 260 265 270

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
 275 280

<210> 5
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Tetranectina-apolipoproteína A-I (1)

<400> 5

Ala Pro Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu
 20 25 30

Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Asp Glu Pro Pro Gln Ser
 35 40 45

Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu
 50 55 60

Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu
 65 70 75 80

Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr
 85 90 95

Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu
 100 105 110

Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met
 115 120 125

Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp
 130 135 140

Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys
 145 150 155 160

Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu
 165 170 175

His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp

5

10

ES 2 688 044 T3

180

185

190

Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr
195 200 205

Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys
210 215 220

Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu
225 230 235 240

His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu
245 250 255

Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu
260 265 270

Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
275 280 285

<210> 6
<211> 284
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión tetranectina-apolipoproteína A1 acortada

<400> 6

Pro Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu
1 5 10 15

Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu
20 25 30

Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro
35 40 45

Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys
50 55 60

Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly
65 70 75 80

Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser
85 90 95

Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe
100 105 110

5

10

ES 2 688 044 T3

Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser
 115 120 125

Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp
 130 135 140

Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val
 145 150 155 160

Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His
 165 170 175

Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg
 180 185 190

Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser
 195 200 205

Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu
 210 215 220

Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His
 225 230 235 240

Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg
 245 250 255

Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser
 260 265 270

Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
 275 280

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un polipéptido en una célula procariota, que comprende las siguientes etapas:
- 5 - suprimir en una célula procariota que es auxótrofa para al menos un aminoácido al menos una auxotrofia para un aminoácido introduciendo en el genoma de una célula procariota original un ácido nucleico que suprime una auxotrofia para aminoácidos de la célula procariota original,
- 10 - cultivar la célula procariota con supresión de auxotrofias para aminoácidos que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un medio mínimo de crecimiento definido químicamente y recuperar el polipéptido de la célula procariota o del periplasma de la célula procariota o del medio,
- 15 en el que el valor de producto cuando se usa la cepa procariota con supresión de auxotrofias es más alto que el valor de producto que se puede obtener con una cepa protótrofa natural correspondiente.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el cultivo de la célula procariota con supresión de auxotrofias requiere el enriquecimiento con uno o dos o tres o cuatro aminoácidos menos en el medio de crecimiento que el requerido para el cultivo de la célula procariota original sin supresión de auxotrofias.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la célula procariota con supresión de auxotrofias tiene al menos una auxotrofia para aminoácidos adicional.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias no se añade durante el cultivo.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el cultivo es en ausencia del aminoácido correspondiente a la auxotrofia que se ha suprimido en la célula procariota con supresión de auxotrofias.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la célula procariota es una célula de *E. coli*.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el polipéptido es una cadena de anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio único, un scFv, un scFab, o un conjugado de uno de los anteriores con un polipéptido que no sea un anticuerpo.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el polipéptido es un conjugado de un scFv o scFab con un agente citotóxico.

Figura 1

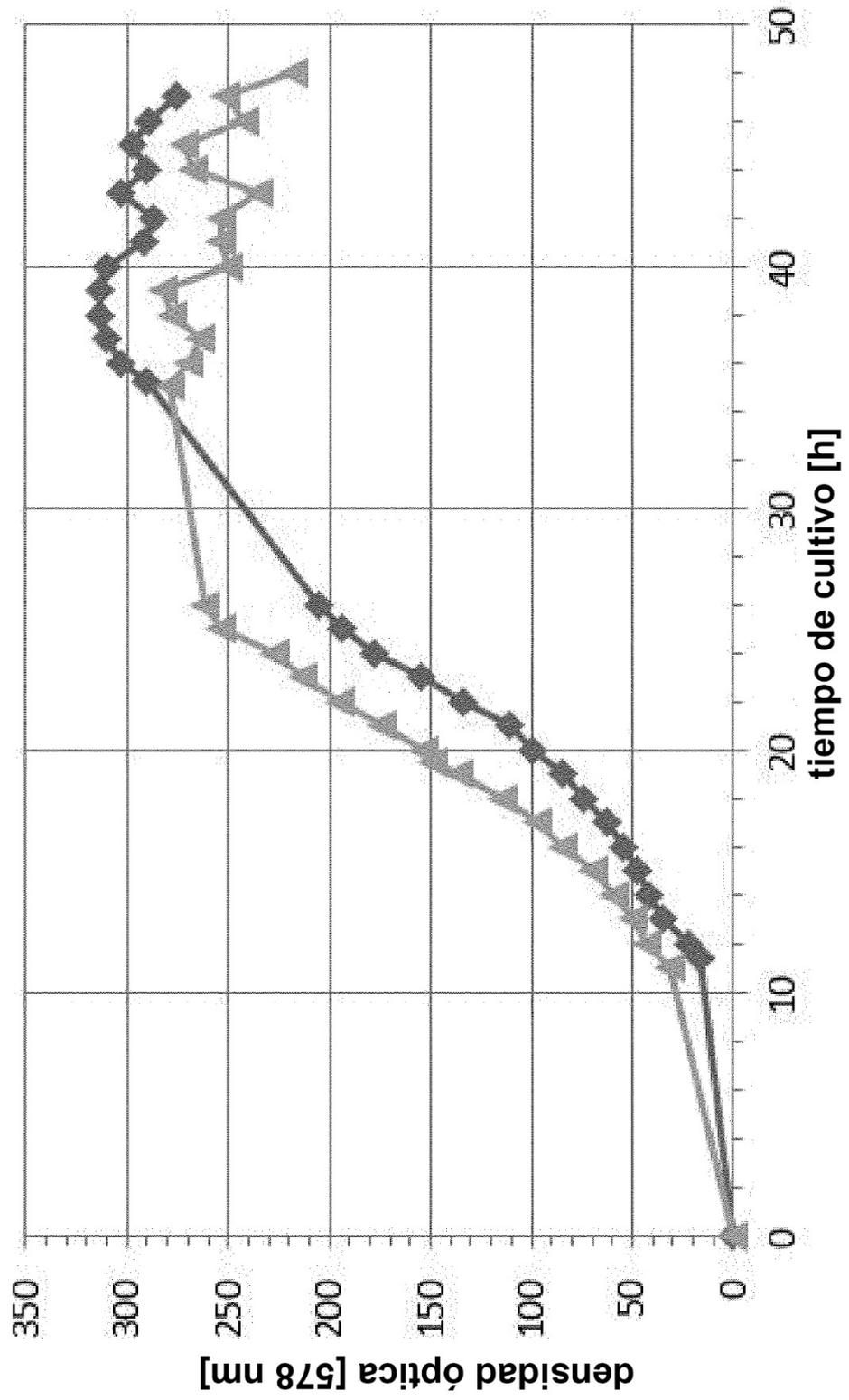


Figura 2

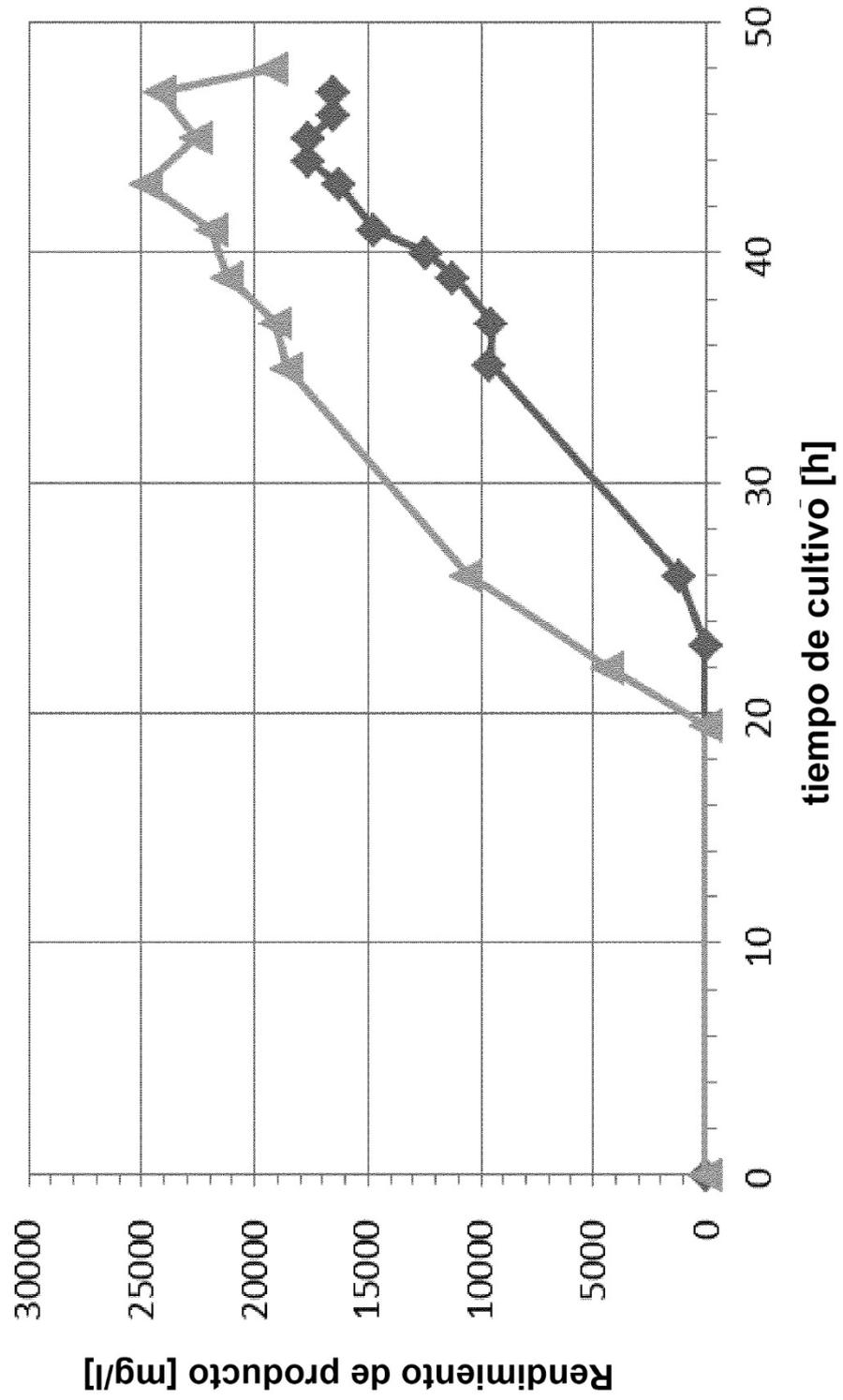


Figura 3

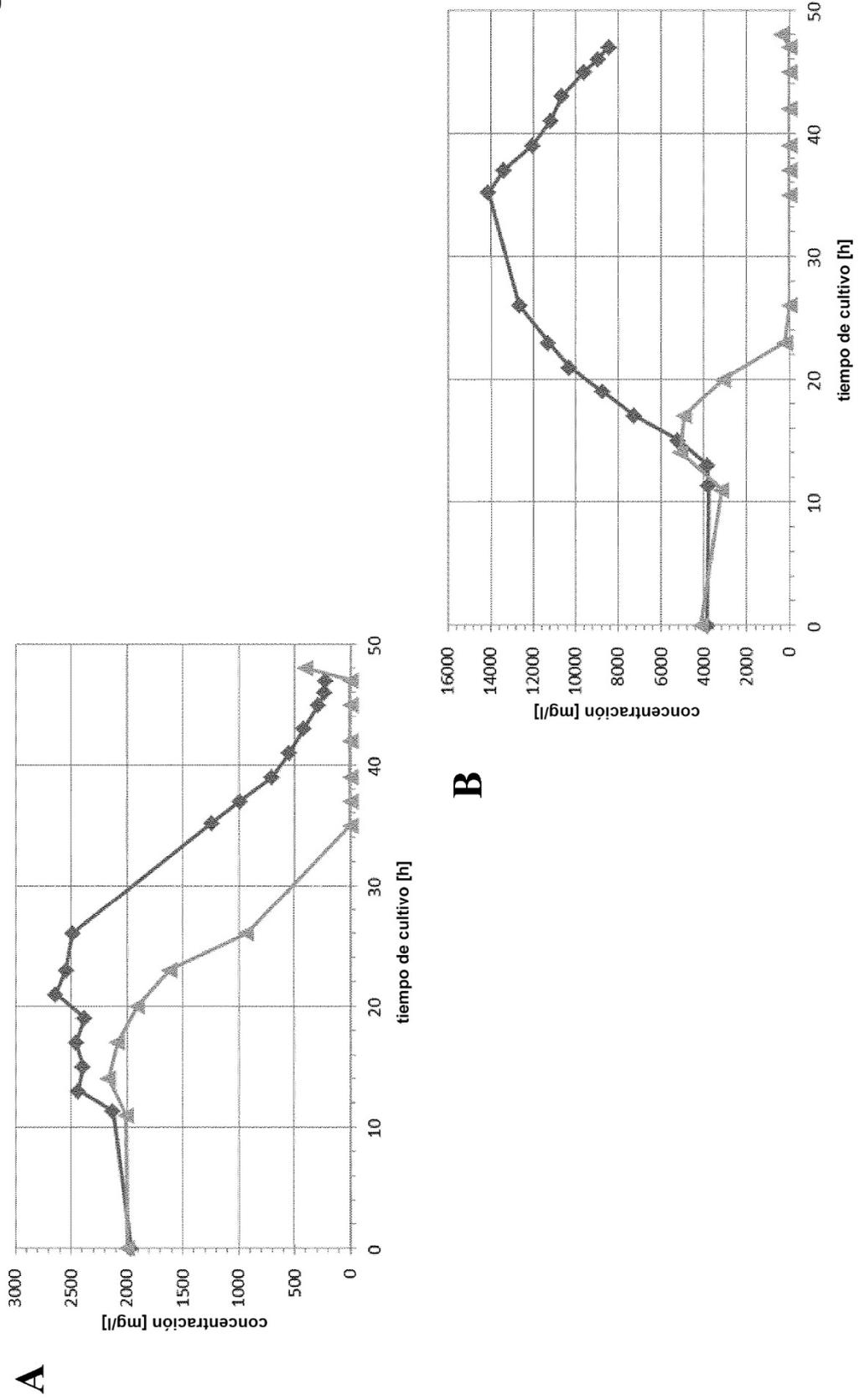


Figura 4

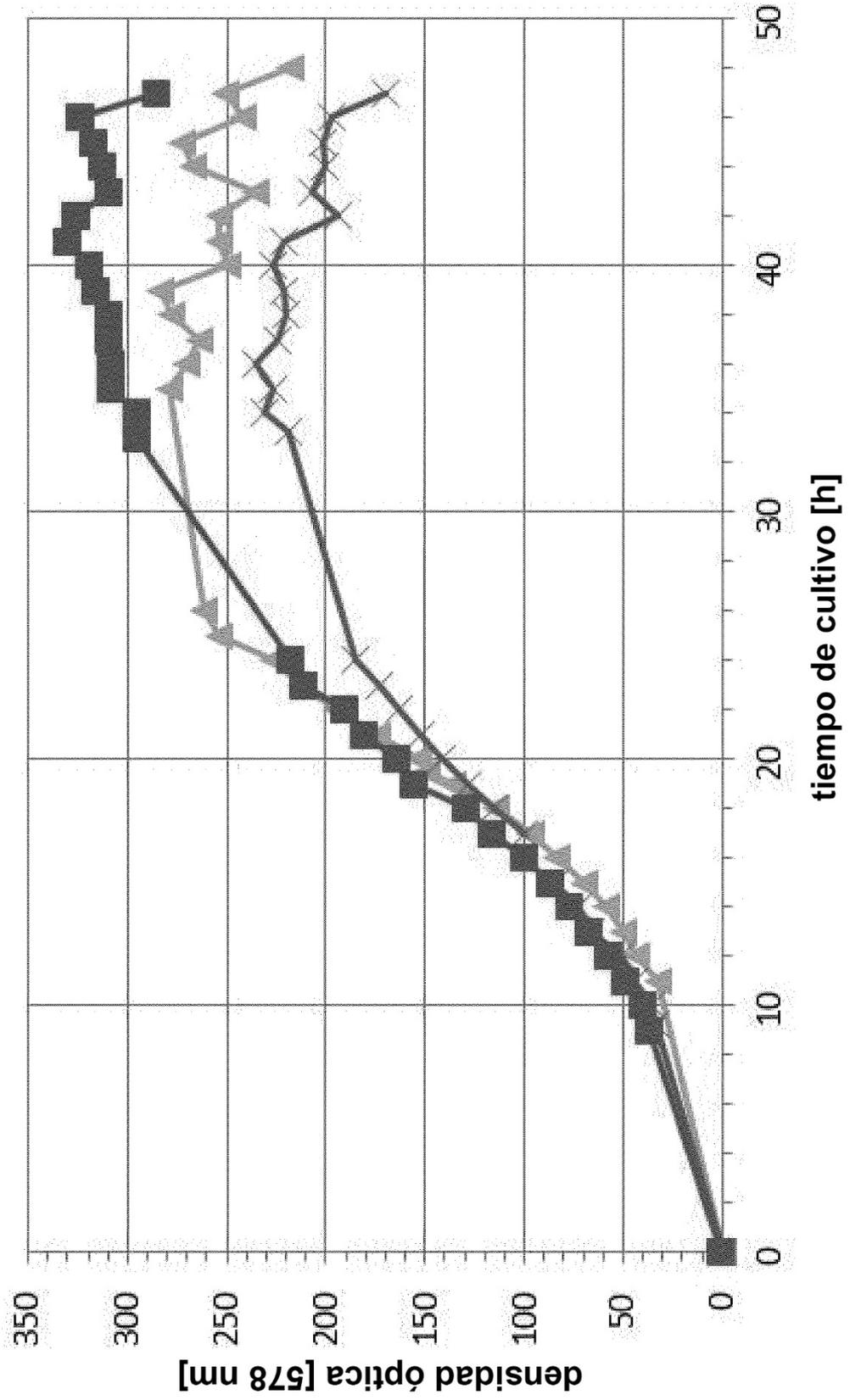


Figura 5

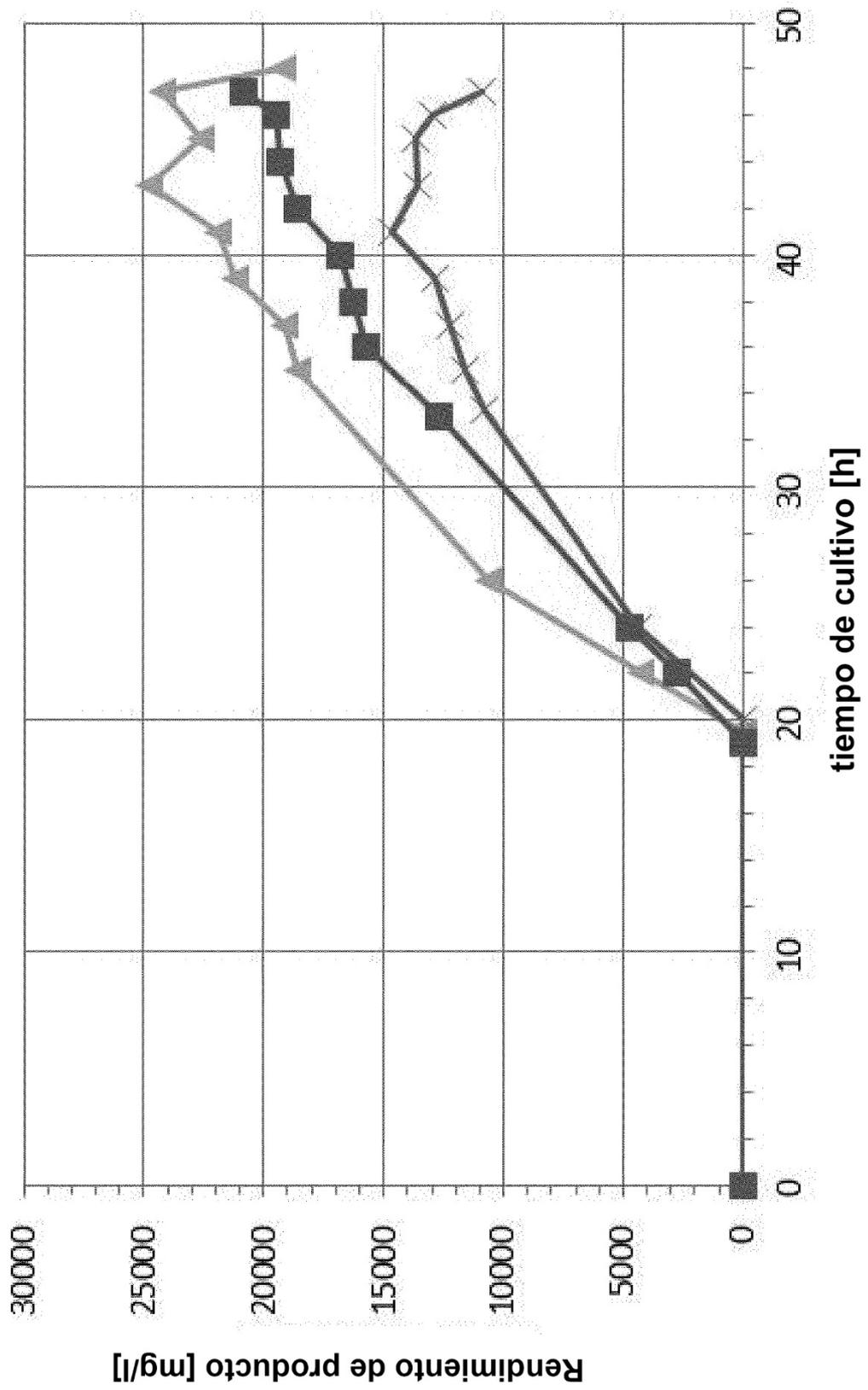


Figura 6

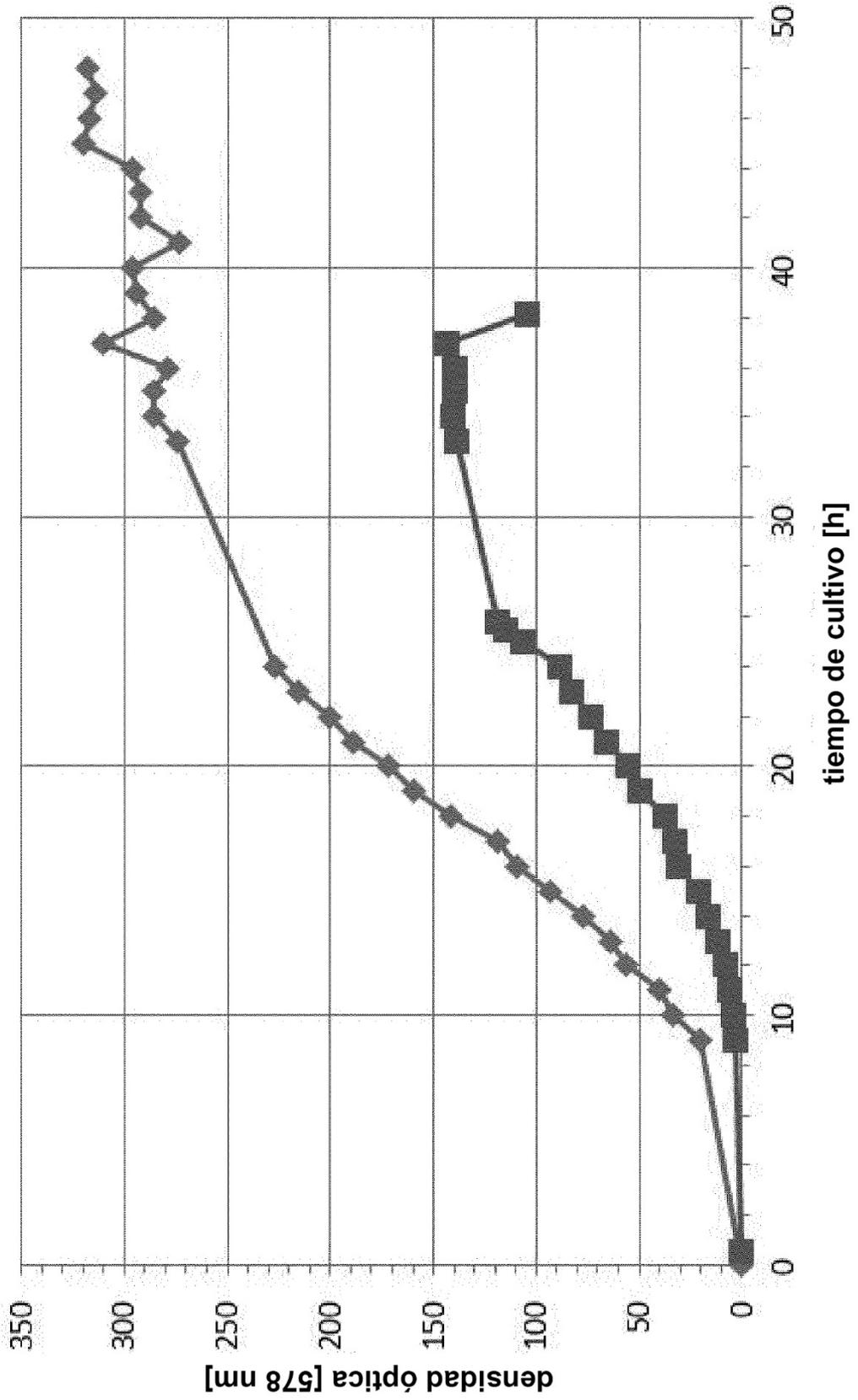


Figura 7

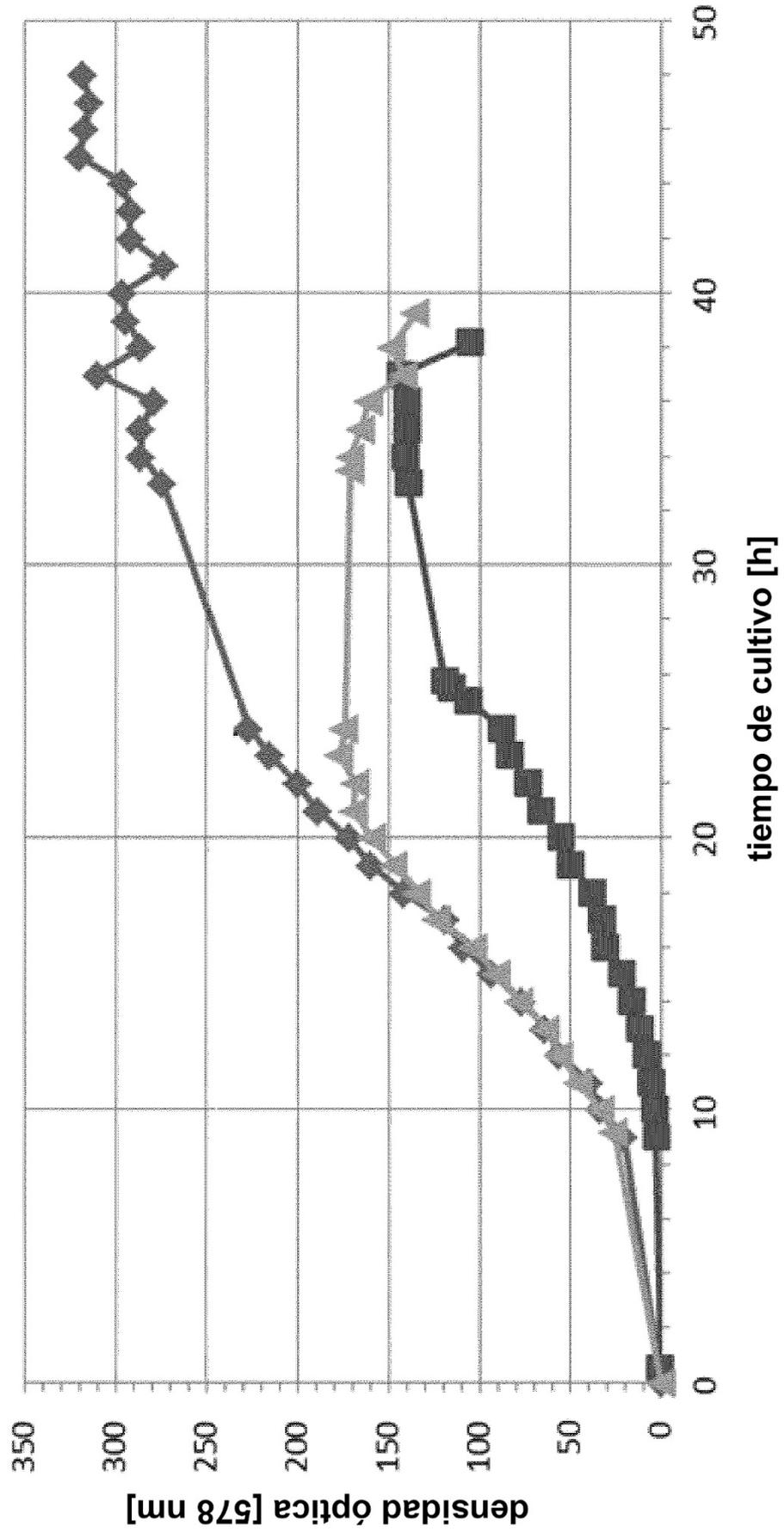


Figura 8

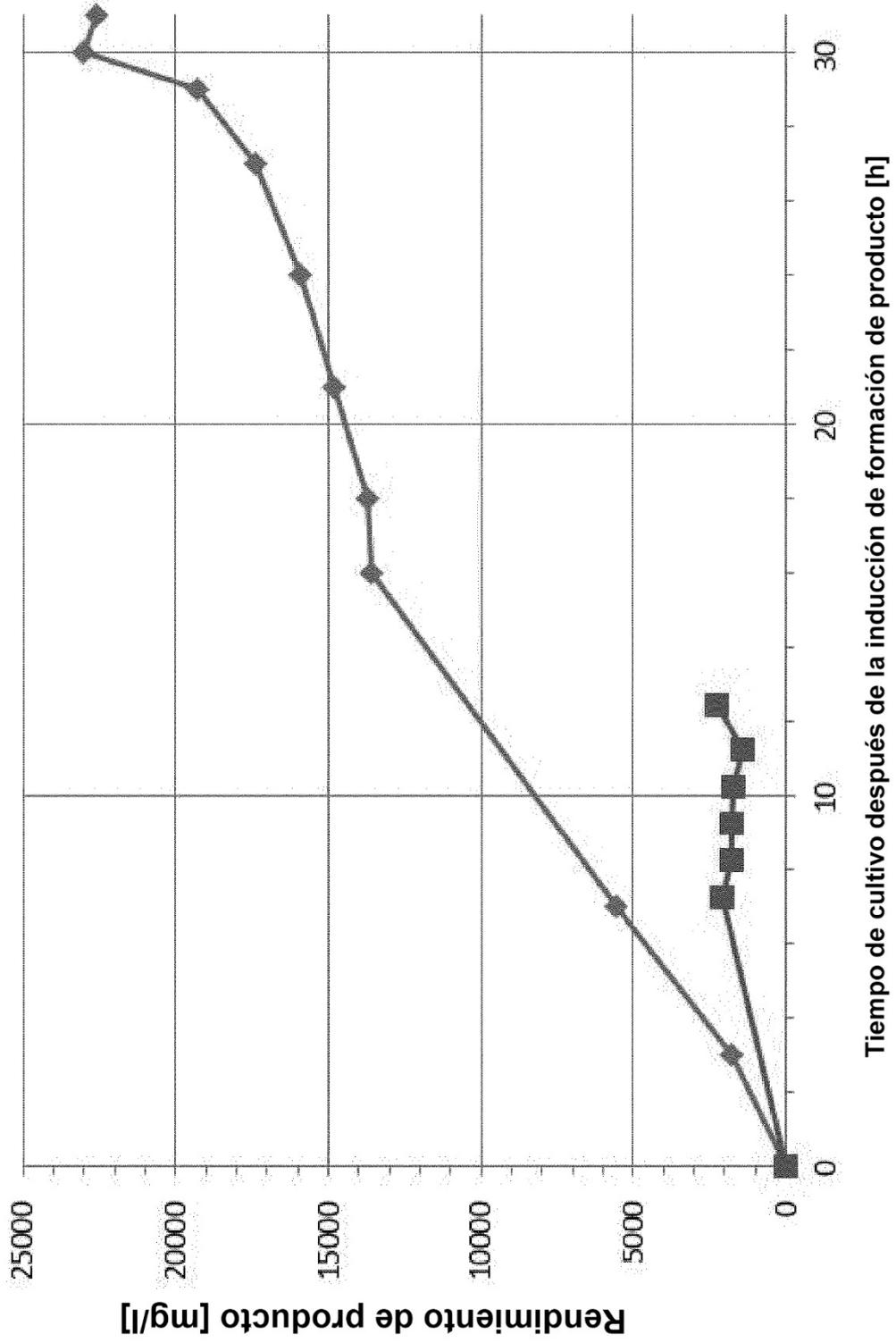


Figura 9

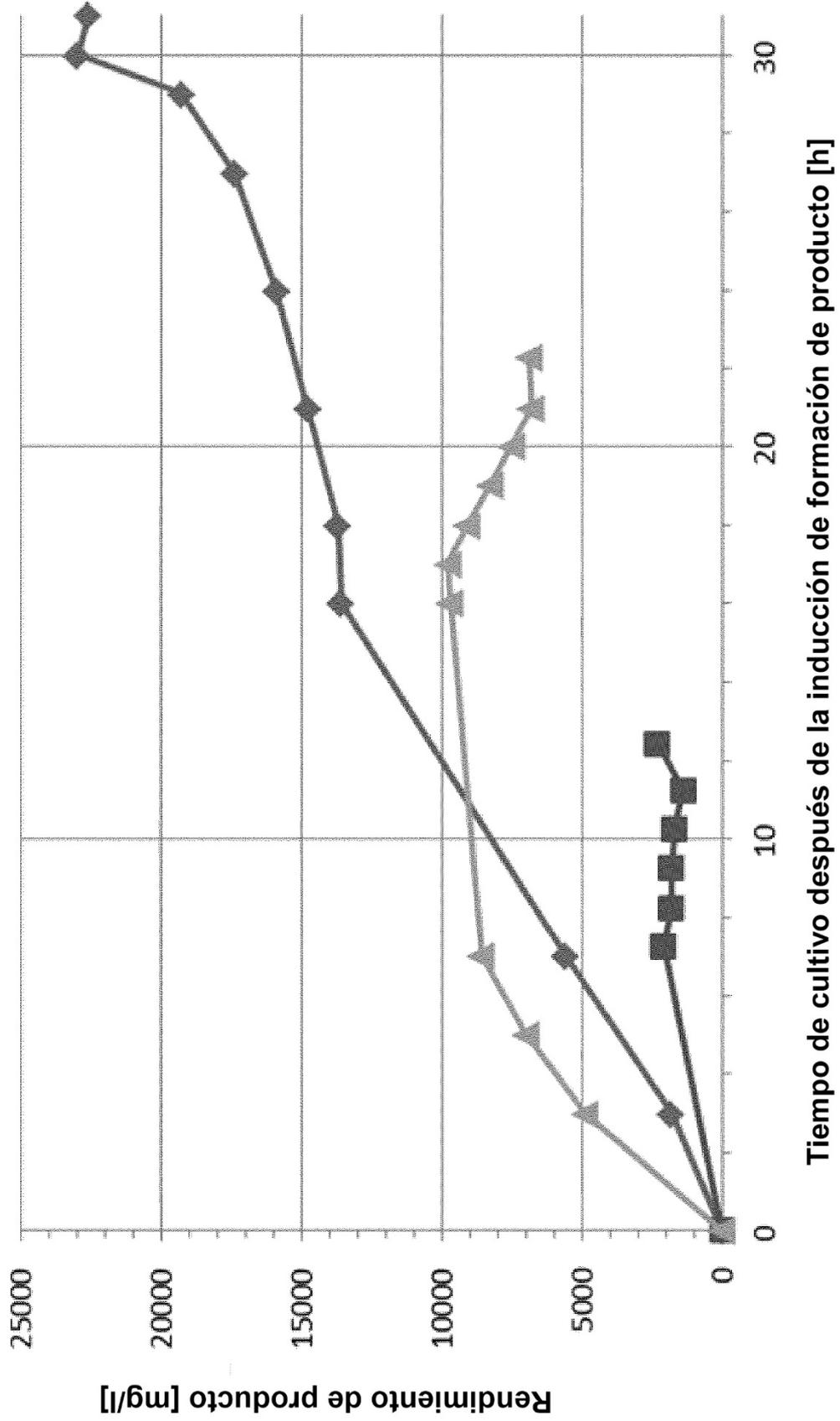


Figura 10

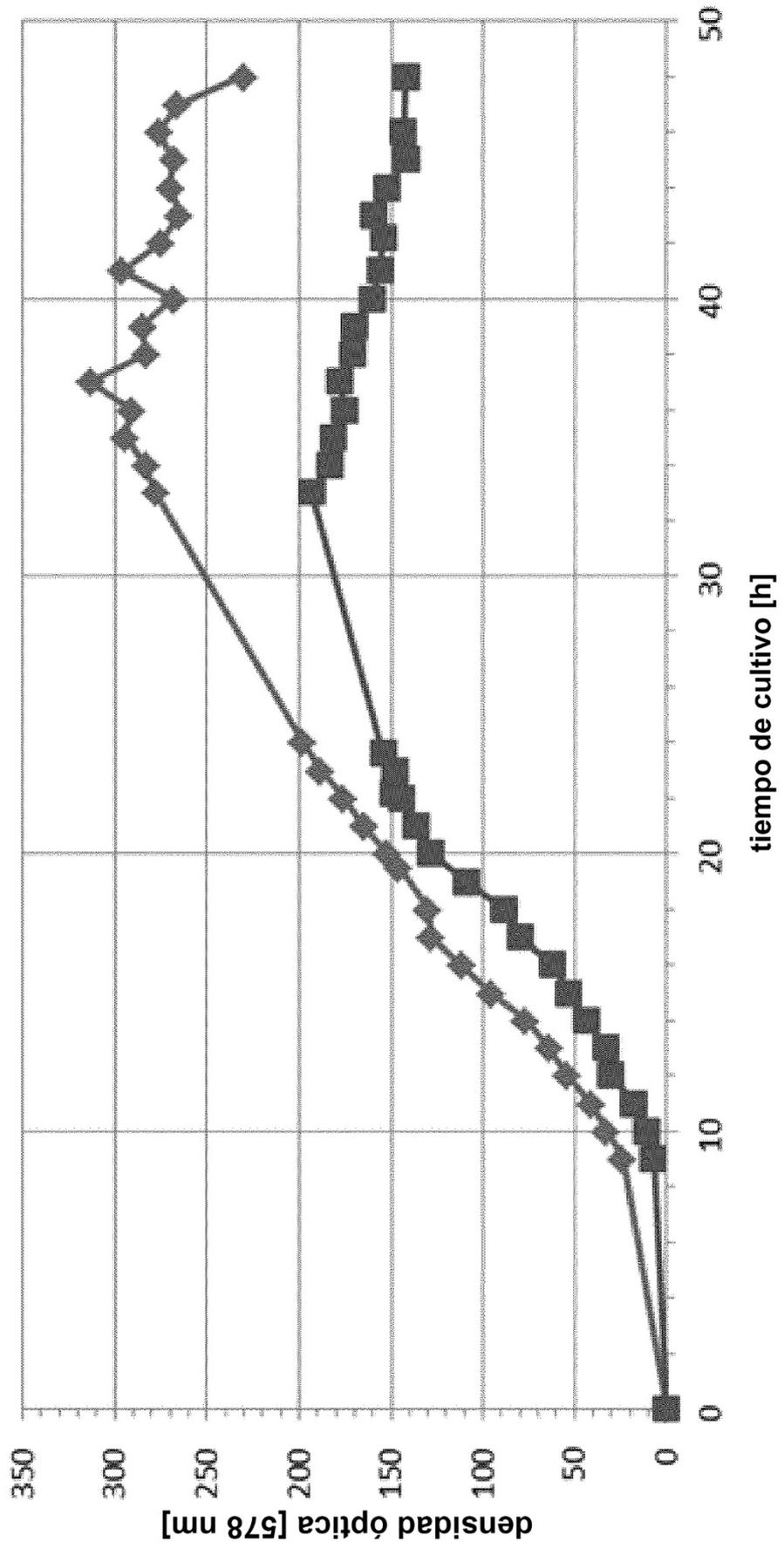


Figura 11

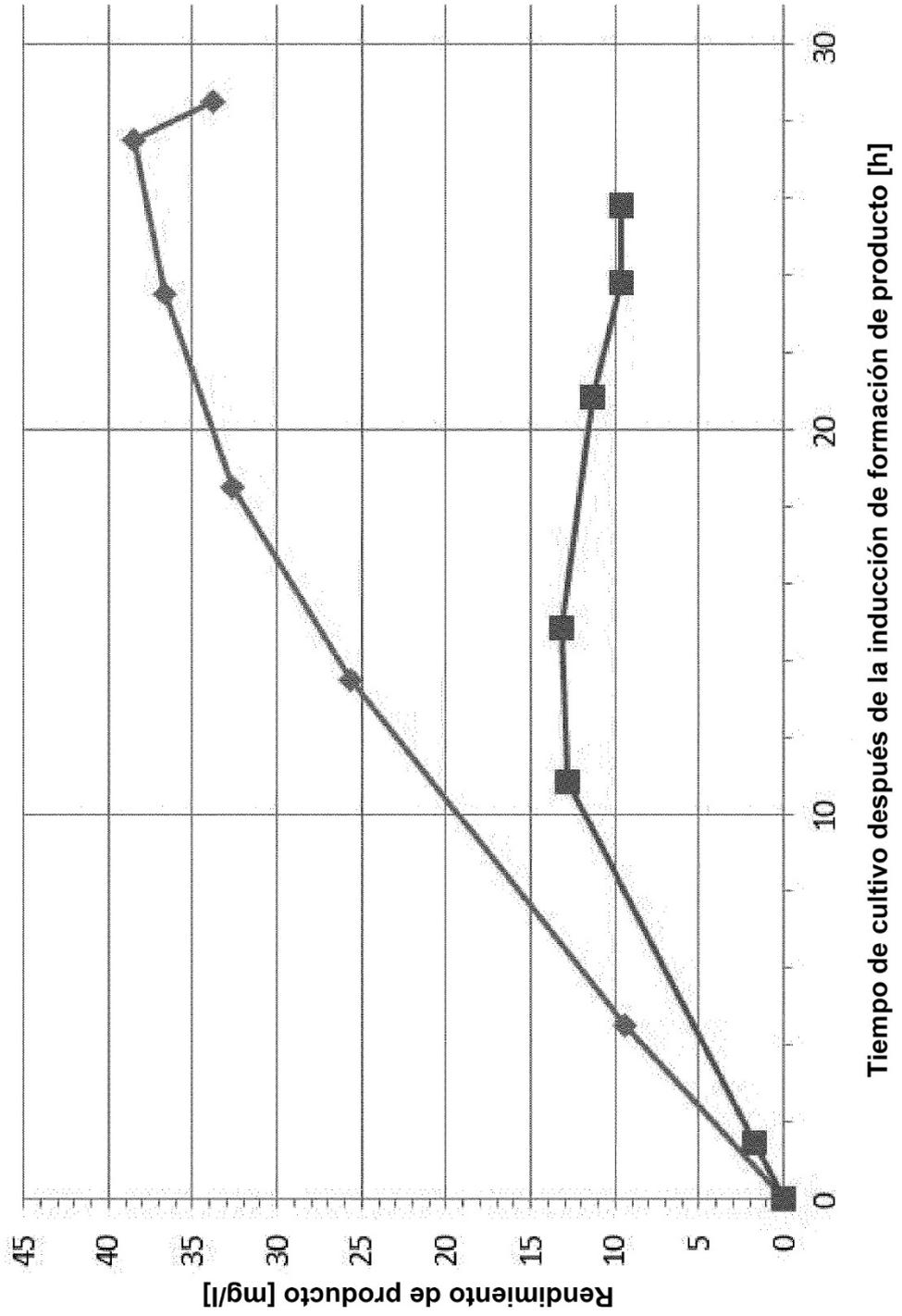


Figura 12

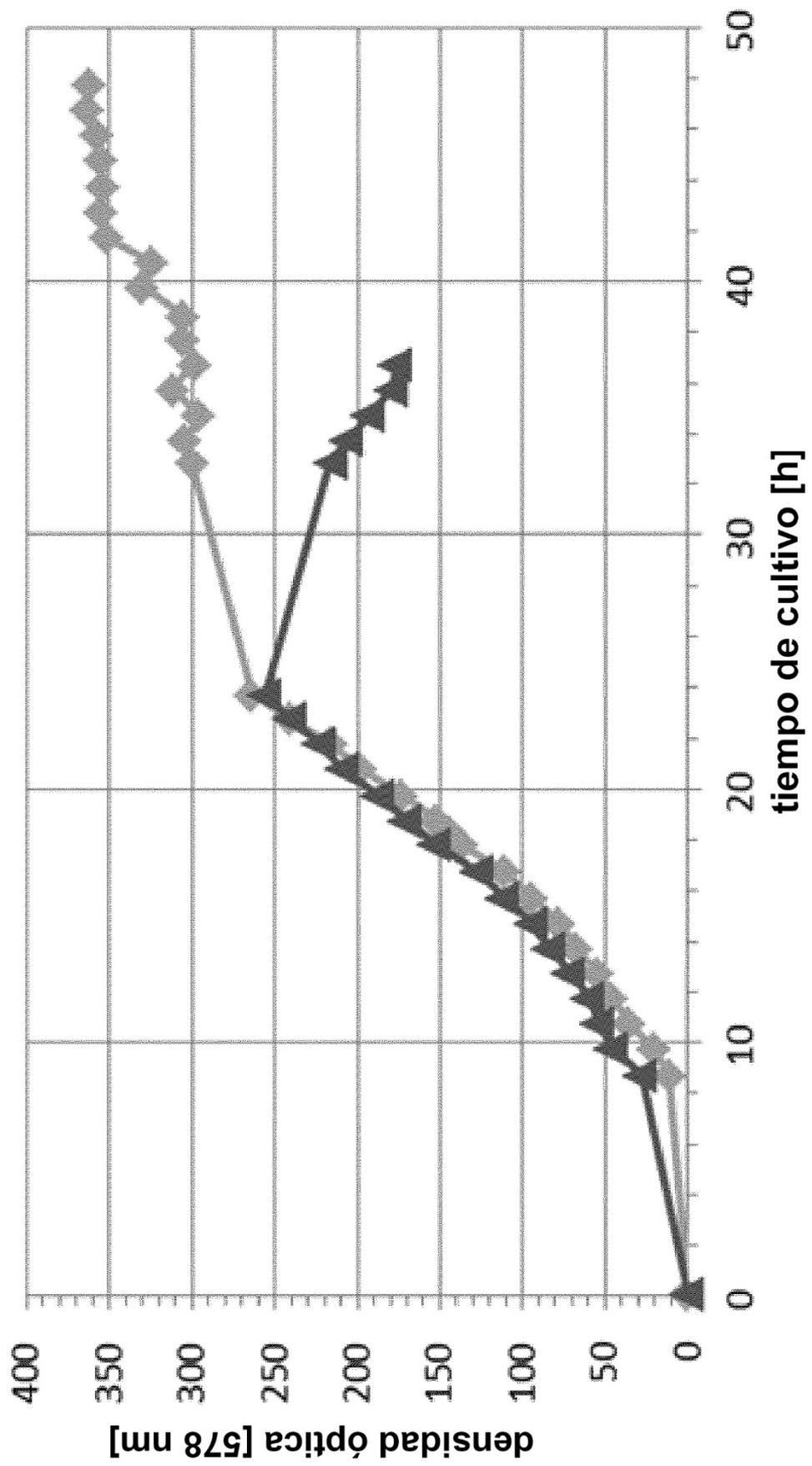


Figura 13

