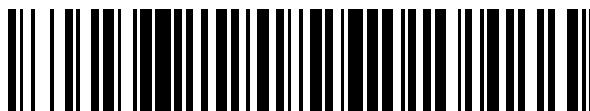


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 169**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/KR2013/001980**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13137622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13760453 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2825633**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de células de E. coli para alta densidad**

30 Prioridad:

**12.03.2012 KR 20120025230**

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

**22.10.2019**

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)  
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon  
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**HUH, YONG HO;  
OH, EUH LIM;  
JUNG, SUNG YOUB y  
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 728 169 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

Procedimiento de cultivo de células de *E. coli* para alta densidad

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* para alta densidad. Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* para la maximización de su proliferación, que comprende el paso del crecimiento de las células de *E. coli* y la inducción de la expresión de una proteína recombinante con el fin de maximizar la cantidad de masa celular y la proteína recombinante.

**Técnica antecedente**

10 *E. coli* es la célula huésped más comúnmente usada para la producción en masa de varias proteínas útiles debido a su alta tasa de crecimiento y técnicas avanzadas en los campos de la fermentología y la ingeniería genética, disponibles para el cultivo y la ingeniería genética de *E. coli*. Una producción de alto rendimiento de la proteína recombinante requiere el cultivo de las células de *E. coli* transformadas en una alta densidad. Para este fin, varios tipos de medios tales como un medio complejo, un medio sintético, y un medio semisintético, y diversos procedimientos para la alimentación de los medios tales como una alimentación a una tasa constante, un incremento gradual de la tasa de alimentación, una alimentación exponencial, o el control específico de la tasa de crecimiento, el control de pH-stat y DO-stat, y el control de la concentración de ácido acético y glucosa se han desarrollado y usado para obtener altas densidades de células de *E. coli*. Pero, en la práctica, existe un procedimiento específico y condiciones óptimas para el cultivo de cada una de las cepas transformadas. De este modo, para una producción de proteínas de alto rendimiento, es importante seleccionar el mejor procedimiento para la alimentación de los medios y el cultivo de las células.

25 En general, en la producción de proteína recombinante por *E. coli* recombinantes, las características del promotor correspondiente y la proteína expresada afectan a la tasa de crecimiento celular y la productividad por cada unidad de las células. Para el sistema donde la expresión de proteínas está controlada por un promotor fuerte, una expresión rápida de la proteína recombinante puede perturbar el equilibrio del metabolismo energético de la célula huésped, lo cual inhibe el crecimiento celular. En especial, cuando la proteína expresada tiene un efecto negativo directo sobre las células huésped, inhibe el crecimiento de las células huésped a una mayor medida.

30 Por estas razones, la expresión de proteínas bajo un fuerte promotor inducible se convierte en una carga significativa para las células huésped. De este modo, dado que esta carga se reduce al mínimo, la producción en masa de proteína recombinante se puede conseguir con mayor facilidad. Teniendo en cuenta las condiciones anteriores, el momento de la expresión óptima puede variar dependiendo de las características de la proteína expresada, incluso cuando se usan los mismos tipos de vectores de expresión y células huésped para la expresión de proteínas. Además, la significación de los efectos del momento de la expresión en el crecimiento celular y las tasas de expresión puede variar. Además, la tasa de crecimiento celular y masa celular afecta a la producción de proteínas. Con la misma productividad por célula, el uso de una mayor masa celular puede incrementar el rendimiento de la producción de proteínas. Por lo tanto, es importante establecer condiciones óptimas de cultivo para la producción de la masa celular con una alta densidad en la producción de proteínas recombinantes por medio de microorganismos recombinantes.

40 Dado que la expresión de la proteína de *E. coli* transformada está estrechamente relacionada con varios factores ecológicos/fisiológicos intracelulares relacionados con el medio de crecimiento (la estabilidad y el número de copias de plásmidos, la transcripción y la eficacia de traducción, la solubilidad de las proteínas expresadas, la proteólisis, la integridad de la membrana, etc.), es crítico establecer una condición óptima de cultivo para maximizar el rendimiento de la producción y la productividad. Por lo tanto, con el fin de expresar una proteína recombinante con un alto rendimiento, un inductor apropiado tal como IPTG necesita ser añadido y se necesitan alimentar medios con la composición adecuada para la producción de proteínas por medio del procedimiento apropiado a los medios de cultivo de *E. coli* recombinante a alta densidad. Si es necesario, la composición de los medios y el procedimiento de alimentación de la misma se tienen que modificar para la producción de proteína recombinante (Yee y Blanch, 1992, *Bio/Technol.* 10, 1550 a 1556).

50 Los procedimientos para la expresión de una proteína recombinante en *E. coli* se pueden dividir en tres tipos representativos. El primer procedimiento es la expresión de una proteína recombinante tal como una forma soluble en el citoplasma de la célula de *E. coli*. El segundo procedimiento es la expresión de una proteína recombinante al periplasma de la célula de *E. coli* por el uso de una secuencia de señal. El otro procedimiento es la expresión de la proteína en una forma de cuerpo de inclusión (IB), y este procedimiento es más comúnmente usado para la expresión de una proteína con un alto rendimiento.

55 Cuando las proteínas se expresan en una forma IB, las células de *E. coli* necesitan ser cultivadas en una alta densidad. En detalle, con la tasa de expresión de proteínas similar por cada célula, dado que las células de *E. coli* se cultivan en mayor densidad, se puede obtener el mayor rendimiento de productos de proteína. Por lo tanto, ha habido muchos estudios sobre la investigación del procedimiento para hacer crecer células de *E. coli* en una alta densidad. La Patente Coreana Núm. 10-0235315 desvela un uso de la proteína de fusión para la sobreexpresión de

una hormona de crecimiento humano, pero se encontró que la masa celular era de aproximadamente 90 a 100 g por litro. Además, se observa que la absorbancia final ( $OD_{600}$ ) no fue mayor que 150, en el proceso de producción de la proteína recombinante bajo la condición de fermentación de dos pasos (*Microb Cell Fact.* 7 Ago 2008; 7:26). Del mismo modo, una condición de cultivo de alta densidad para la producción de proteínas como salmosin produjo solamente 65,70 g de IB por litro (*J. Microbiol. Biotechnol.* 21 Oct 2011; (10):1053 a 1056). Además, la condición de cultivo para la producción de IFN gamma produjo sólo aproximadamente 100 g de masa celular por litro de un cultivo celular (*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Feb 2004; 31(2):63 a 69. Epub 19 Feb 2004). Ki Jun Jeong *et al.*, *Bioprocess an Biosystems Engineering*, vol. 34, Núm. 7, 2011, páginas 811 a 817 y Lee *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, 2001, páginas 127 a 132 describen estrategias de alimentación pH-stat para el cultivo de alta densidad de *E. coli*. Como resultado de ello, todavía hay una gran necesidad para el desarrollo de un procedimiento para el cultivo de células de *E. coli* para una densidad más alta.

Sobre la base de estos antecedentes, en un esfuerzo para desarrollar un procedimiento para la producción de proteína recombinante con un alto rendimiento, los presentes inventores han encontrado que cuando las células huésped son cultivadas con diferentes tipos de medios entre un paso de cultivar las células transformadas de *E. coli* y un paso de inducir la expresión de la proteína recombinante, se puede lograr una producción en masa de proteína recombinante en la *E. coli* transformada, para de ese modo completar la presente invención.

### Divulgación de la invención

#### Problema técnico

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* para alta densidad.

#### Solución al problema

Como una forma de realización para lograr el objeto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* para alta concentración.

Para ser más específicos, la presente invención proporciona un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* transformadas con un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, que comprende (i) el cultivo de células de *E. coli* en el modo de cultivo por lotes en un medio de crecimiento celular hasta que el pH de los medios se incrementa en 0,1 o más; (ii) el cultivo de las células de *E. coli* en el modo de cultivo alimentado por lotes por pH-stat con la adición del primer medio de alimentación tras los incrementos de pH del medio de cultivo celular; y (iii) el cultivo de las células de *E. coli* en el modo de cultivo alimentado por lotes con la adición del segundo medio de alimentación tras el incremento de la absorbancia a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 120 a 180 en el cultivo celular, en el que el pH del cultivo durante el cultivo del paso (iii) se incrementa por medio de la disminución de la tasa de alimentación del segundo medio de alimentación; y (iv) la inducción de una expresión de la proteína recombinante durante el paso (iii), en el que la proteína recombinante se expresa únicamente en el paso (iii) sólo cuando el cultivo celular alcanza un valor de  $OD_{600}$  de 150 o superior.

Como se usa en la presente memoria, el término "medio de crecimiento celular" se refiere a un medio que se usa para cultivar células de *E. coli*. Para el propósito de la presente invención, el medio de crecimiento celular puede comprender un medio de cultivo inicial para proporcionar *E. coli* con un entorno de crecimiento, y una solución de metales traza para el control del pH y la promoción del crecimiento de *E. coli*, pero no se limita a esto. Un tipo de medio de cultivo inicial no está limitado, pero preferentemente contiene triptona, extracto de levadura, NaCl,  $KH_2PO_4$ , y  $(NH_4)_2HPO_4$ . Y la solución de metales traza no se limita a, pero preferentemente contiene ácido cítrico,  $FeCl_2$ ,  $H_3BO_3$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ , y EDTA. Además, el medio de crecimiento celular puede estar compuesto preferentemente por 20 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, 207,5 g/l de  $KH_2PO_4$ , 50 g/l de  $(NH_4)_2HPO_4$ , 268 g/l de ácido cítrico, 270 g/l de  $FeCl_2$ , 30 g/l de  $H_3BO_3$ , 100 g/l de  $MnCl_2$ , 15 g/l de  $CuCl_2$ , 25 g/l de  $Na_2MoO_4$ , 25 g/l de  $CoCl_2$ , 20 g/l de  $ZnCl_2$ , y 0,5 M de EDTA. De manera opcional, el medio de crecimiento celular puede comprender un componente adicional seleccionado por aquéllos con experiencia en la técnica.

Los procedimientos de la presente divulgación pueden comprender, además, la inducción de la expresión de la proteína recombinante durante o después de la realización del paso (iii). Preferentemente, la *E. coli* puede ser inducida para expresar una proteína recombinante de manera simultánea con la realización del paso (iii). Más preferentemente, un inductor de la expresión de proteínas se puede añadir al segundo medio de alimentación. Además, la expresión de la proteína recombinante puede ser inducida por medio de la adición de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Más preferentemente, la concentración del IPTG añadido puede ser de 0,1 a 0,5 mM. IPTG se añade preferentemente cuando la absorbancia del cultivo celular a 600 nm ( $OD_{600}$ ) se incrementa a 120 o superior.

De acuerdo con otra forma de realización, HM11201 (KCCM-10660P), que es una cepa de *E. coli* transformada para expresar un fragmento Fc de inmunoglobulina, se cultiva en el segundo medio de alimentación que contiene IPTG en el paso (iii) para inducir la expresión de la proteína recombinante.

Como se usa en la presente memoria, el término "*E. coli* transformada" se refiere a una cepa de *E. coli* en la que el polinucleótido que codifica una proteína de interés se introduce a medida que es transportado por un vector de expresión o a medida que se inserta en el ADN cromosómico, y que puede expresar y producir la proteína recombinante de interés. Para el propósito de la presente invención, no se imparten limitaciones particulares al polinucleótido, el vector de expresión, y la proteína recombinante a ser producida por *E. coli*. Como un sistema de expresión más conveniente, se puede emplear un vector de expresión que contiene un operador Lac. En este caso, se puede usar IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) como un inductor para inducir la expresión de una proteína recombinante de interés. En una forma de realización, la *E. coli* transformada es *E. coli* HM11201 (KCCM-10660P), que puede expresar un fragmento Fc de inmunoglobulina (Patente Coreana Núm. 824505).

El término "cultivo por lotes" como se usa en conjunción con el cultivo bacteriano, se refiere a un proceso de cultivo en el que se cultivan las células en un medio de cultivo que comprende los materiales y nutrientes inicialmente suministrados. Si bien sufre de la desventaja de ser incapaz de complementar los nutrientes, el cultivo por lotes goza de la ventaja de garantizar una alta tasa de éxito para un cultivo del que las condiciones son imposibles de ajustar o que es apto para ser contaminada. Por lo tanto, el cultivo por lotes se usa principalmente en una fase de desarrollo o en un nivel de laboratorio. Para el propósito de la presente invención, el cultivo por lotes se lleva a cabo hasta que las células de *E. coli* transformadas entran en una fase de proliferación sustancial para incrementar el cultivo celular en el pH. En este sentido, el cultivo por lotes se continúa hasta el momento en que el pH del cultivo celular se incrementa en 0,1 en relación con el del medio de cultivo inicial.

El término "el primer medio de alimentación", como se usa en la presente memoria, se refiere a un medio que se alimenta a través de una forma del tipo alimentado por lotes en un punto de tiempo cuando *E. coli* comienza a proliferar después del cultivo por lotes y el pH incrementa, de forma que se promueva el crecimiento de *E. coli*. Para el propósito de la presente invención, el primer medio de alimentación comprende extracto de levadura y glucosa, y se puede añadir al medio de crecimiento celular. Las cantidades de extracto de levadura y glucosa en el primer medio de alimentación no están en particular limitadas, sino que pueden ser determinadas de manera adecuada por aquéllos con experiencia en la técnica. Preferentemente, el primer medio de alimentación contiene extracto de levadura en una cantidad entre 200 y 400 g/l y glucosa en una cantidad de 700 a 800 g/l.

El término "el segundo medio de alimentación", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a un medio que se usa en el cultivo de tipo alimentado por lotes para inducir *E. coli* crecida a un cierto nivel para expresar y producir una proteína recombinante de interés. Para el propósito de la presente invención, el segundo medio de alimentación comprende extracto de levadura y glucosa y se puede añadir al medio de crecimiento celular. De manera opcional, el segundo medio de alimentación puede comprender un inductor para la inducción de la expresión de una proteína recombinante, tal como IPTG. No se imparten limitaciones particulares a las cantidades de extracto de levadura, glucosa, e IPTG, sino que pueden ser determinadas por aquéllos con experiencia en la técnica. Preferentemente, el segundo medio de alimentación contiene extracto de levadura en una cantidad entre 200 y 400 g/l, y glucosa en una cantidad de 500 a 700 g/l y, de manera opcional, IPTG en una cantidad de 0,1 a 0,5 mM.

El término "cultivo alimentado por lotes", como se usa en conjunción con el cultivo celular, se refiere a un proceso de cultivo en el que un medio de nutriente se alimenta de una manera controlada a un fermentador durante todo el proceso de fermentación desde el principio hasta el final de la fermentación sin extracción de cultivos de células del fermentador. En un tipo de cultivo alimentado por lotes, un nutriente de interés se alimenta a una tasa en proporción a la tasa de absorción del microorganismo, de forma que la concentración del nutriente en el cultivo se pueda controlar a un valor predeterminado. Con esta ventaja, el tipo de cultivo alimentado por lotes se emplea para la investigación de fermentación con retroalimentación de sustrato, retroalimentación de producto o retroalimentación de proliferación, y encuentra aplicaciones en la industria de la fermentación asociada con la levadura de pan, los aminoácidos, los materiales antibióticos, etc. A los efectos de la presente invención, el cultivo alimentado por lotes se puede aplicar a la producción de una proteína recombinante de interés en *E. coli* crecida a un cierto nivel.

Preferentemente, la condición de cultivo de la presente invención se puede referir al sistema en el que el cultivo por lotes y el cultivo alimentado por lotes se llevan a cabo como un solo proceso, y no se separan.

El procedimiento para el cultivo de células de *E. coli* transformadas de acuerdo con la presente invención puede ser un proceso pH-stat en el que el primer y un segundo medio de alimentación son alimentados de forma secuencial tras un incremento del pH, mientras que *E. coli* recombinante se cultiva en un cultivo por lotes. En este contexto, el primer medio de alimentación puede ser alimentado de una manera de incremento gradual mientras que el segundo medio de alimentación puede ser alimentado de una manera de disminución gradual. La fermentación pH-stat es un proceso de alimentación por lotes donde los nutrientes son alimentados cuando el pH se eleva como resultado del agotamiento de los nutrientes, sin tener en cuenta la concentración de oxígeno disuelto. De acuerdo con DO-stat, los nutrientes se alimentan cuando hay un incremento en la concentración de DO que surge del agotamiento del sustrato. Sin embargo, para *E. coli*, la fermentación DO-stat es inadecuada debido a que *E. coli* puede crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En la presente invención, solamente un incremento en el pH, que indica el agotamiento de los nutrientes, se usa como un índice del crecimiento celular. De este modo, la presente invención proporciona un procedimiento de cultivo celular de alta densidad sobre la base de una referencia más precisa.

De acuerdo con el procedimiento de cultivo de *E. coli* de acuerdo con la presente invención, preferentemente, el primer medio de alimentación en el paso (ii) se alimenta a una tasa de 200 y 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 800 rpm y el segundo medio de alimentación en el paso (iii) se alimenta a una tasa de 200 y 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 800 rpm. Más preferentemente, la tasa de alimentación del primer medio de alimentación y la velocidad de agitación en el paso (ii) se pueden incrementar paso por paso en un intervalo de 200 a 400 ml/h y un intervalo de 400 a 800, respectivamente, de acuerdo con las tasas de crecimiento específicas de cada cepa. Por ejemplo, el incremento de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación pueden implicar un total de 3, 4, o 5 pasos, y preferentemente 3 pasos. Para ser más específicos, el procedimiento anterior se puede llevar a cabo por medio del incremento de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación del primer medio de alimentación en 3 pasos, en el que el primer medio de alimentación se alimenta primero a una tasa de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 600 rpm, y luego a una tasa de alimentación de 250 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm, y por último a una tasa de alimentación de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm. De manera específica, en el paso 1, el primer medio de alimentación se alimenta a una tasa de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 y 600 rpm; en el paso 2, el primer medio de alimentación se alimenta a una tasa de 250 a 350 ml/h con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm; y en el paso 3, el primer medio de alimentación se alimenta a una tasa de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm. Más preferentemente, el primer medio de alimentación se puede alimentar a una tasa de 200 a 270 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 550 rpm en el paso 1; a una tasa de 270 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 550 a 650 rpm en el paso 2; y a una tasa de 300 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 650 a 800 rpm en el paso 3.

Incluso más preferentemente, el procedimiento de cultivo de células de *E. coli* en la presente invención se puede llevar a cabo de acuerdo con lo presentado a continuación: la tasa de alimentación del segundo medio de alimentación y la velocidad de agitación en el paso (iii), que induce la expresión de proteína a través del agotamiento del medio de nutrientes, se disminuyen en pasos con una tasa de alimentación que varía de 200 a 400 ml/h y una velocidad de agitación comprendida entre 400 y 800 rpm de acuerdo con los cambios de pH. Por ejemplo, la disminución de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación puede implicar un total de 3, 4, o 5 pasos, y preferentemente 3 pasos. Para ser específico, el procedimiento anterior se puede llevar a cabo por medio de la disminución de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación del primer medio en 3 pasos, en el que el primer medio de alimentación se alimenta primero a una tasa de alimentación de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm, y luego a una tasa de alimentación de 250 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm, y por último a una tasa de alimentación de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 600 rpm. De manera específica, el segundo medio de alimentación se alimenta a una tasa de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm en el paso 1, a una tasa de 250 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm en el paso 2, y a una tasa de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de los 400 y 600 rpm en el paso 3. Más preferentemente, el segundo medio de alimentación se alimenta a una tasa de 300 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 650 a 800 rpm en el paso uno, a una tasa de 270 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 550 a 650 rpm en el paso dos, y a una tasa de 200 a 270 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 550 rpm en el paso 3.

De acuerdo con una forma de realización, la *E. coli* HM11201 transformada se cultiva a 37 °C en un medio de crecimiento suplementado con metales traza en un cultivo por lotes, con aireación a una tasa de 1 vvm, y luego, cuando el pH incrementa, el primer medio de alimentación se alimenta para llevar a cabo el cultivo alimentado por lotes durante 25 a 30 hs hasta que la absorbancia a 600 nm ( $OD_{600}$ ) alcanza de 120 a 180 (Ejemplo 1-1). A una  $OD_{600}$  de 120 a 180, el segundo medio de alimentación se alimenta en diversas condiciones para producir una proteína recombinante de interés (Ejemplo 1 y 2). En particular, la inducción de la expresión de la proteína recombinante a una  $OD_{600}$  de 150 o más alta permite que las células de *E. coli* crezcan finalmente hasta una  $OD_{600}$  de 200 o superior y a una densidad de 200 g/l o superior.

#### Efectos ventajosos de la invención

Como se describió con anterioridad, la *E. coli* transformada para producir una proteína recombinante de interés se puede hacer crecer a una alta concentración por el uso del procedimiento de cultivo de la presente invención. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención incrementa la productividad de las células, así como también el rendimiento de la producción de la proteína recombinante, y puede ser ampliamente aplicado a la producción eficaz de proteínas recombinantes.

#### **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 muestra un perfil de crecimiento de la *E. coli* HM11201 transformada (KCCM-10660P) (FIG. 1a), y los niveles de expresión de una proteína como se mide por medio de electroforesis (FIG. 1b). (FIG. 1a) La línea gris significa la temperatura, la línea gruesa significa pH, la línea de puntos significa la velocidad de agitación, y la línea delgada significa tasa de aireación.

#### **Modo de invención**

Una mejor comprensión de la presente invención se puede obtener a través de los siguientes ejemplos que se

exponen para ilustrar, pero no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

### Ejemplo 1: Fermentación de HM11201

HM11201 (KCCM-10660P), una cepa de *E. coli* transformada para expresar un fragmento de Fc de inmunoglobulina, se seleccionó como una cepa representativa y se usa para optimizar los procedimientos de alimentación del medio de una manera paso por paso de acuerdo con la fermentación alimentado por lotes pH-stat con el objetivo de lograr un cultivo celular de alta densidad y una expresión de alto rendimiento.

#### Ejemplo 1-1: Establecimiento de Condiciones de Cultivo Celulares de Alta Densidad de *E. coli* Transformado

La *E. coli* transformada se cultivó a 37 °C en un cultivo por lotes en un medio de cultivo inicial (20 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 207,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,7), con aireación a 1 vvm, y luego de una manera de alimentación por lotes por el uso del primer medio de alimentación (de 300 a 400 g/L de extracto de levadura y de 700 a 800 g/L de glucosa) suplementado con una solución de metales traza (268 g/L de ácido cítrico, 270 g/L de FeCl<sub>2</sub>, 30 g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 100 g/L de MnCl<sub>2</sub>, 15 g/L de CuCl<sub>2</sub>, 25 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 25 g/L de CoCl<sub>2</sub>, 20 g/L de ZnCl<sub>2</sub>, y 0,5 M de EDTA).

Cuando las células se cultivan a un cierto nivel y el pH del cultivo celular ha incrementado a un nivel más alto que el número de control PID [P (proporcional), I (integral), D (diferencial)], como resultado de la disminución de la nutrientes en medio, en especial la fuente de carbono, se produjeron los cambios en el metabolismo y el crecimiento de *E. coli* y la lisis celular con descuido a largo plazo. Para resolver este problema, el medio de alimentación se alimentó de modo alimentado por lotes de una manera paso por paso de forma proporcional a la tasa de crecimiento específica de la cepa. En el caso de que la tasa de alimentación del medio de alimentación fuera superior a la tasa de crecimiento de la cepa, el metabolismo y el crecimiento de *E. coli* se inhibieron como resultado de la acumulación de acetato. Por lo tanto, dado que la tasa de alimentación se incrementa de una manera paso por paso, también se incrementa la velocidad de agitación. En detalle, cuando se empleó un fermentador de 50 ℓ, en el paso donde la densidad celular es más alta que 7 x 10<sup>9</sup> células/ml, el primer medio de alimentación se alimentó a una tasa de 200 ml/h a 300 ml/h con agitación a una velocidad de 400 a 600 rpm en el paso 1. Por otra parte, en el paso donde la densidad celular es de 2 x 10<sup>10</sup> a 3 x 10<sup>10</sup> células/mL, el primer medio de alimentación se alimentó a una tasa de 250 ml/h a 350 ml/h con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm. También, en el paso donde la densidad celular es de 3 x 10<sup>10</sup> a 4,5 x 10<sup>10</sup> células/ml del primer medio de alimentación se alimentó a una tasa de 300 a 400 ml/h con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm, y cuando la densidad celular es mayor que 4,5 x 10<sup>10</sup>, la tasa de alimentación del primer medio de alimentación y la velocidad de agitación se mantuvieron constantes a la máxima dentro del intervalo en el que el crecimiento de células no estaba impedido.

El cultivo durante 25 a 30 horas bajo dicha condición permitió que la *E. coli* transformada creciera hasta una OD<sub>600</sub> de 120 a 180.

#### Ejemplo 1-2: Establecimiento de Condición de Cultivo para la producción de Alto Rendimiento de Proteína Recombinante

Para establecer las condiciones óptimas para la expresión de proteínas de *E. coli* HM11201 cultivadas en el Ejemplo 1-1, se usaron diversas composiciones como los segundos medios de alimentación y se alimentaron a diferentes tasas.

Como resultado, una composición que comprende extracto de levadura a una concentración entre 200 y 400 g/L y glucosa a una concentración de 500 a 700 g/L se encontró que era útil como el segundo medio de alimentación para la expresión de la proteína recombinante con un alto rendimiento.

Además, la tasa de alimentación del medio y la velocidad de agitación se redujeron en forma escalonada, para convertir el proceso desde el paso de crecimiento de la cepa hasta el paso de producción de la proteína recombinante, a través del agotamiento de medio de nutriente y el control de la condición de agitación en el cultivo alimentado por lotes. En detalle, el control paso por paso de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación se controló de manera proporcional a los incrementos del pH y la entrada de solución alcalina. La tasa de alimentación y la velocidad de agitación se establecieron, respectivamente, para ser de 300 a 400 ml/h y de 600 a 800 rpm para el paso 1, de 250 a 350 ml/h y de 500 a 700 rpm para el paso 2, y de 200 a 300 ml/h y de 400 a 600 rpm para el paso 3. Para inducir la expresión de proteína, se añadió de 0,1 a 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

En una fase tardía del proceso de cultivo para la promoción de la expresión de la proteína recombinante, *E. coli* disminuye en actividad. En este punto de tiempo, la adición de un exceso de medio provocó la dilución de *E. coli* y la acumulación de ácido acético, se redujo el crecimiento de *E. coli* y de este modo disminuyó la expresión de la proteína recombinante. Para resolver estos problemas, los nutrientes suministrados a *E. coli* se redujeron por medio de la alimentación del medio de alimentación en disminución de las tasas en la fase tardía del proceso de cultivo. El suministro reducido de nutrientes altera el metabolismo de *E. coli* para provocar la liberación de iones de amonio al medio que, a su vez, incrementó el pH del medio. Por lo tanto, se observó que el cultivo celular se mantuviera a un pH de 6,8 a 7,5 hasta que el cultivo se completó incluso cuando no se hizo ningún ajuste adicional al intervalo de pH

constante (FIG. 1). La FIG. 1 muestra un perfil de crecimiento de la *E. coli* transformada HM11201 (KCCM-10660P), y los niveles de expresión de la proteína recombinante como se mide por medio de electroforesis. Como se puede observar en la FIG. 1, la producción de la proteína recombinante de interés a partir de *E. coli* se incrementó de manera proporcional a la cantidad de tiempo dada.

- 5 Mientras tanto, la *E. coli* transformada se cultivó con variaciones en la composición del medio de alimentación y el tiempo de alimentación de IPTG. Como resultado, para la proliferación de *E. coli*, cuando las células se cultivan durante un período más largo de tiempo durante la fase temprana de cultivo para alcanzar una densidad más alta posible de cultivo celular y luego se induce la expresión de la proteína recombinante diana durante la fase tardía de cultivo, la proliferación de *E. coli* se puede maximizar, lo que incrementa la productividad de la cepa (Tabla 1).
- 10 Después de un cultivo de 45 horas, se midieron la OD<sub>600</sub> final, la masa celular final y las proteínas.

Tabla 1

[Tabla 1]

Masa Celular Producida de acuerdo con Composiciones de Medio y Momento de la Inducción de la Expresión.				
Condición	A	B	C	D
Primer medio de alimentación	200 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)	200 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)	400 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)	200 g/L (Levadura), 800 g/L (Glucosa)
Segundo medio de alimentación	200 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)	400 g/L (Levadura), 500 g/L (Glucosa)	200 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)	300 g/L (Levadura), 700 g/L (Glucosa)
OD <sub>600</sub> en 20 hs	94,7	103,0	142	146
OD <sub>600</sub> de Inducción	20 hs : 94,7	25 hs : 122,6	25 hs : 163	30 hs : 183
OD <sub>600</sub> Final	182,4	186,6	229,2	268
Masa Celular Final (g/L)	184,1	189,5	207,4	263,6
Extracto de proteína (g/L)	1,72	-	-	2,46

- 15 Como se entiende a partir de los datos de la Tabla 1, una OD<sub>600</sub> final de 200 o mayor, y una masa celular de 200 g o mayor, se pueden obtener de acuerdo con la composición del medio de alimentación y el momento de la inducción de la expresión.

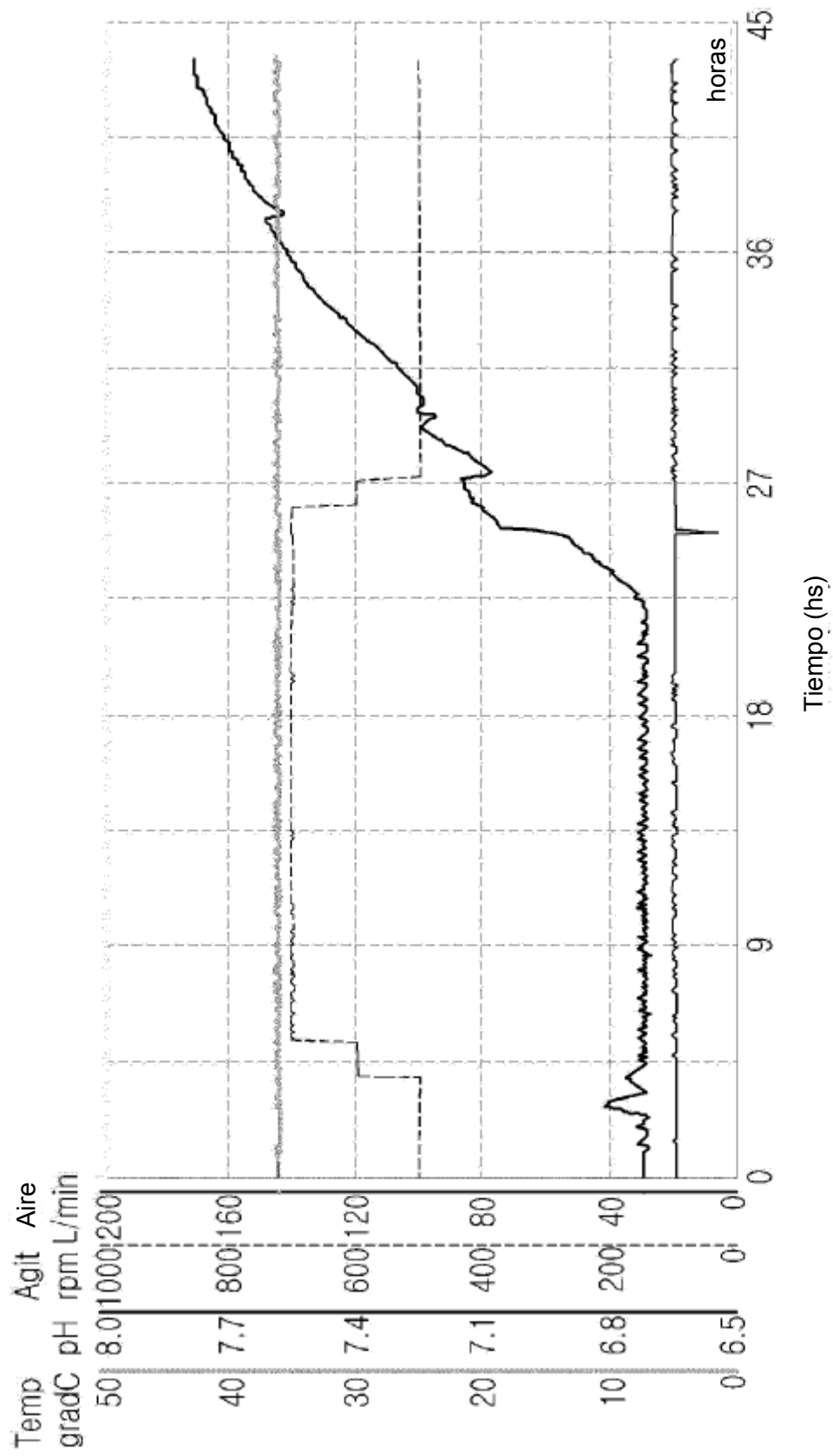
Como se puede observar en la FIG. 1, Fc de inmunoglobulina se puede expresar en un nivel alto, con un incremento de 1,5 veces en la masa celular. Por lo tanto, las condiciones son efectivas para la mejora de la productividad, y el procedimiento de la presente invención es ventajoso en la expresión de proteínas con un alto rendimiento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de cultivo de células de *E. coli* transformadas con un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, que comprende:
  - 5 (i) el cultivo de células de *E. coli* en el modo de cultivo por lotes en un medio de crecimiento celular hasta que el pH de los medios se incremente en 0,1 o más;
  - (ii) el cultivo de las células de *E. coli* en el modo de cultivo alimentado por lotes por pH-stat con la adición del primer medio de alimentación tras los incrementos de pH del medio de cultivo celular; y
  - 10 (iii) el cultivo de las células de *E. coli* en el modo de cultivo alimentado por lotes con la adición del segundo medio de alimentación tras el incremento de la absorbancia a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 120 a 180 en el cultivo celular, en el que el pH del cultivo durante el cultivo del paso (iii) se incrementa por medio de la disminución de la tasa de alimentación del segundo medio de alimentación; y
  - (iv) la inducción de una expresión de la proteína recombinante durante el paso (iii), en el que la proteína recombinante se expresa únicamente en el paso (iii) sólo cuando el cultivo celular alcanza un valor de OD<sub>600</sub> de 150 o superior.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína es un fragmento Fc de inmunoglobulina.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa de *E. coli* transformada comprende un vector de expresión que lleva un operador Lac.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de la proteína recombinante se induce por medio de la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el IPTG se
  - (a) agrega a una concentración de 0,1 a 0,5 mM; o
  - (b) agrega sólo cuando el cultivo celular alcanza un valor de OD<sub>600</sub> de 150 o superior.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer medio de alimentación se alimenta a una tasa de 200 a 400 ml/h en el paso (ii), con agitación a una velocidad de 400 a 800 rpm.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que
  - (a) la tasa de alimentación y la velocidad de agitación se incrementan gradualmente en el paso (ii); o
  - (b) el paso (ii) se lleva a cabo por medio del incremento de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación del primer medio de alimentación en 3 pasos, en el que el primer medio de alimentación se alimenta primero a una tasa de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de 400 a 600 rpm, y luego a una tasa de alimentación de 250 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm, y por último a una tasa de alimentación de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo medio de alimentación se alimenta a una tasa de 200 a 400 ml/h en el paso (iii), con agitación a una velocidad de 400 a 800 rpm.
- 35 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la tasa de alimentación y la velocidad de agitación se disminuyen gradualmente en el paso (iii).
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el paso (iii) se lleva a cabo por medio de la disminución de la tasa de alimentación y la velocidad de agitación del segundo medio de alimentación en 3 pasos, en el que el segundo medio de alimentación se alimenta primero a una tasa de alimentación de 300 a 400 ml/h, con agitación a una velocidad de 600 a 800 rpm, y luego a una tasa de alimentación de 250 a 350 ml/h, con agitación a una velocidad de 500 a 700 rpm, y por último a una tasa de alimentación de 200 a 300 ml/h, con agitación a una velocidad de los 400 y 600 rpm.
- 45 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de crecimiento celular consiste en un medio de crecimiento inicial que comprende triptona, extracto de levadura, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y una solución de metales traza que comprende ácido cítrico, FeCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, C<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, y EDTA.
- 50 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer medio de alimentación comprende extracto de levadura a una concentración entre 200 y 400 g/l, y glucosa a una concentración de 700 a 800 g/l.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo medio de alimentación comprende extracto de levadura a una concentración entre 200 y 400 g/l, y glucosa a una concentración de 500 a 700 g/l.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo celular tiene un valor de OD<sub>600</sub> final de 200 o superior.



[Fig. 1a]



[Fig. 1b]

C 21h 45h

