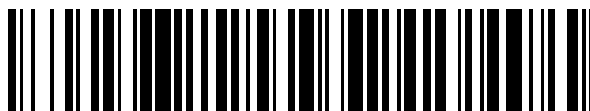


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 973**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013** **PCT/EP2013/057956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13156504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013** **E 13717769 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2839012**

54 Título: **Procedimiento para incrementar la secreción de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

17.04.2012 EP 12164458

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

24.04.2020

73 Titular/es:

GREENOVATION BIOTECH GMBH (100.0%)
Hans-Bunte-Strasse 19
79108 Freiburg , DE

72 Inventor/es:

JOST, WOLFGANG;
KNAPPENBERGER, MATHIAS;
CLAUSSNITZER, DOREEN y
SCHAAF, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 755 973 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 para incrementar la secreción de proteínas recombinantes.

- 5 La presente invención se refiere a la optimización de sistemas de expresión de hongos o plantas recombinantes con la ayuda de procedimientos de expresión adecuados.

10 La producción de proteínas recombinantes en un intervalo de concentración de ng/l a µg/l en plantas ya se ha descrito en una serie de publicaciones. La publicación WO 01/25456 A2 se refiere a un procedimiento para la producción de proteínas que están presentes en musgo sin disolverse en los tejidos de musgo o células de musgo y además se menciona que la productividad puede incrementarse mediante el uso de PVP en un medio de cultivo. A título de ejemplo, esto se muestra para la producción recombinante de VEGF₁₂₁, un homodímero glicosilado pequeño con un tamaño de 28 kDa (Baur *et al.*, Journal of Biotechnology 119 (2005): 332-342). Baur *et al.*, describe la transformación temporal del musgo utilizando PEG. El medio empleado para la producción de VEGF estaba libre de PVP o PEG.

15 Drake *et al.*, Plant Mol. Biol. 52 (2003): 233-241, describe la expresión recombinante de anticuerpos en un cultivo de tejido vegetal de tabaco, es decir, de tejido raíz. Los anticuerpos se secretaron mediante un proceso de rizosecreción en el intervalo de microgramos (µg). Los sistemas efectivos de expresión de plantas basados en la rizosecreción son en su mayor parte cultivos de raíces pilosas que se pueden estimular infectando cualquier tipo de planta con *Agrobacterium rhizogenes* (Gaume *et al.*, Plant Cell Rep. 21 (2003): 1188-1193).

20 Komarnysky *et al.*, Plant Physiology 124 (2000): 927-933 describe la secreción de proteínas recombinantes mediante el proceso de exudación o gutación, en el cual las proteínas son secretadas en el fluido de gutación de las hojas. Los índices de producción diaria estuvieron en un intervalo de 1 µg/g de masa de hojas.

25 Un cultivo de suspensión de tabaco para la expresión recombinante de proteínas heterólogas se describe en Kwon *et al.*, Biotechnology and Bioengineering 81(7) (2003): 870-875. Se utilizaron células de los callos de las plantas transformadas como una línea celular para la producción de IL-12 humana. Como aditivos potenciales para el medio de cultivo de células, se analizó la capacidad de estabilizar la IL-12 de tres polímeros. PVP y PEG no tuvieron efecto, mientras que la gelatina dio como resultado la estabilización de la IL-12 hasta el día 5 del cultivo, cuando las proteasas presentes en el medio llevaron a una disminución de la concentración. Se describen resultados similares en Lee *et al.*, Journal of Biotechnology 96 (2002): 205-211.

30 LaCount *et al.*, Biotechnology Letters 19(1) (1997): 93-96 describe la estabilización de anticuerpos producidos recombinantemente y de GM-CSF, respectivamente, mediante un tratamiento con PVP para su protección contra la degradación de proteasa.

35 Lee y Kim, Biotechnology Letters 24 (2002): 1779-1783 describen el uso de Pluronic F-68 y polietilenglicol para proteger las células presentes en un cultivo de suspensión de tabaco contra daño mecánico en un biorreactor con tanque de agitación.

40 Magnuson *et al.*, Protein Expression and Purification 7, (1996): 220-228 describe la expresión de una cadena pesada de 50 kDa de un anticuerpo monoclonal en un cultivo de suspensión de células de tabaco. La adición de PVP al medio de cultivo dio como resultado un incremento de 35 veces en el rendimiento, que se atribuye a una estabilización de la proteína, así como a la prevención de agregación y acumulación en paredes vasculares. Se encontró un 66% de la proteína en el citoplasma, un 30% en la fracción de la membrana y solamente un 4% en el medio. A pesar de las secuencias de señales secretoras que solamente señalan un pasaje a través de la membrana celular, las moléculas de proteínas grandes que tienen una masa molecular de más de 50 kDa se consideraron demasiado grandes para su paso a través de la pared celular.

45 Schuster *et al.*, Biotechnol. J. 2 (2002): 1-9 describe la producción de un anticuerpo en los protoplastos de musgo. Al cultivarse en una mezcla de medio 3M y W5 en combinación con una transformación de eficiencia mejorada previa según Baur *et al.* (*supra*) el rendimiento se incrementó de 0.1 – 0.5 µg/ml a 8.2 µg/ml.

50 Tsoi y Doran, Biotechnol. Appl. Biochem. 35 (2002): 171-180 describe varios medios de expresión y su respectiva influencia en la expresión de anticuerpos mediante cultivos de suspensión de células de tabaco. El rendimiento de los anticuerpos secretados estuvo entre 20 y 200 µg/50 ml del medio de cultivo.

55 El documento US 2010/035327 A1 se refiere a un aditivo universal para medios de cultivo que se produce a partir de polisacáridos y polipéptidos de arroz y que supuestamente mejora tanto el crecimiento como la secreción de productos celulares. Sin embargo, el problema de la secreción a través de una pared celular no se trata en el mismo.

60 David *et al.*, Journal of Biotechnology 150 (1) (2010): 115-124, se refiere a la producción recombinante de fragmentos de anticuerpos en *Bacillus megaterium*, es decir una célula que no tiene pared celular.

Baur *et al.*, Plant Biotechnology Journal 3 (3) (2005): 331-340, describe el *P. patens* como un sistema de expresión, así como una secreción incrementada del factor de crecimiento humano recombinante (VEGF) mediante el uso de aditivos (PVP) y mediante la expresión de albúmina de suero humano.

Decker *et al.*, Bioprocess and Biosystems Engineering, enero 31 (1) (2008): 3-9, en general aborda condiciones de cultivo en biorreactores con musgos y glicoingeniería de plantas específicas.

Twyman *et al.*, Trends in Biotechnology 21 (12) (2003): 570-578, explica el uso de plantas como sistemas de expresión recombinantes. Los sistemas de transfección, secuencias de señal y estabilidad del ARNm se abordan con respecto al rendimiento.

A pesar de la disponibilidad de procedimientos conocidos para incrementar la productividad de plantas y células vegetales en la producción recombinante de proteínas heterólogas, los sistemas de plantas aún son menos productivos que las células de animales, tales como por ejemplo los sistemas de expresión de CHO establecidos. Por consiguiente, existe la constante necesidad de incrementar aún más la productividad de sistemas de expresión de plantas. Además, la producción de proteínas secretadas es deseable, de modo que las células productoras no necesiten destruirse y se puedan utilizar para una producción posterior.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos de expresión mejorados, así como medios para los mismos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una proteína recombinante en células que tienen una pared celular, que comprende las etapas de secretar la proteína recombinante a través de la pared celular por medio de la expresión de la proteína presente en las células en un medio de cultivo que contiene una combinación de un polímero de superficie activa y iones de metal monovalente y que tienen una osmolaridad de por lo menos 0.22 osmol/l. Otros aspectos de la presente invención son dichos medios de cultivo, así como composiciones para materiales. En particular, la etapa de secreción es un incremento en la secreción. Dicho incremento usualmente se define en comparación con las células no tratadas. Además, la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones. A continuación, se describen las formas de realización particulares y preferentemente los parámetros, que pueden proporcionarse en combinación con otros.

Una producción exitosa y económica de sustancias biofarmacéuticas requiere una secreción exitosa de proteínas, así como una cantidad incrementada de producto [mg/l a g/l]. Además, las paredes celulares actúan como un filtro de exclusión por tamaños debido a su estructura (macro-) molecular. En la producción de proteínas recombinantes en células vegetales u hongos, este hecho evita una secreción de productos que tengan un tamaño de más de 90 kDa en el medio de cultivo, lo cual podría ser ventajoso para un procesamiento posterior. Aunque en realidad las proteínas producidas de esta manera, siempre que las mismas estén provistas de un péptido de señal secretoria, son transportadas a través de la membrana celular, las mismas tienden a acumularse en el espacio apoplástico, es decir en el compartimento ubicado entre la membrana celular y el borde exterior de la pared celular de la planta, por otro lado. La secreción de proteínas más pequeñas que tienen por lo menos 50 kDa también se disminuye. En primer lugar, la presente invención incrementa la producción de proteínas y, además, sorprendentemente mejora la secreción de las proteínas. Las proteínas producidas según la presente invención pueden ser de cualquier tamaño, aunque las ventajas particulares se observan con proteínas más grandes. Por consiguiente, las proteínas producidas según la presente invención preferentemente tienen un tamaño de más de 40 kDa, más de 50 kDa, más de 55 kDa, más de 60 kDa, más de 65 kDa, más de 70 kDa, más de 75 kDa, más de 80 kDa, más de 85 kDa o más de 90 kDa. Las proteínas también pueden ser dímeros o heterómeros de dichas proteínas.

Los iones de metal monovalente preferentemente se seleccionan de entre iones de metal alcalino, tales como Li, Na, K, Rb o Cs. De manera particularmente preferida, los iones de metal monovalente comprenden o son iones de Na.

Preferentemente, el ion de metal, por ejemplo, el ion de Na, está presente en el medio en una concentración de por lo menos 20 mM, de manera particularmente preferida en una concentración de por lo menos 30 mM, por lo menos 40 mM, por lo menos 50 mM, por lo menos 60 mM, por lo menos 70 mM, por lo menos 80 mM, por lo menos 90 mM, por lo menos 100 mM. Preferentemente, el ion de metal presente en una de estas concentraciones es sodio.

La adición del ion de metal conlleva un incremento en la osmolaridad, mejorando así la secreción a través de la pared celular mientras que al mismo tiempo causa considerable estrés en la célula, lo cual a su vez da como resultado una desaceleración o detención completos del crecimiento celular. La producción de proteína también se desacelera. La osmolaridad preferentemente es de por lo menos 0.33 osmol/l, por lo menos 0.34 osmol/l, por lo menos 0.35 osmol/l, por lo menos 0.36 osmol/l, por lo menos 0.37 osmol/l, por lo menos 0.38 osmol/l o por lo menos 0.4 osmol/l. En particular, la osmolaridad está dentro de un intervalo de 0.32 osmol/l a 0.6 osmol/l o también de 0.35 osmol/l a 0.55 osmol/l.

El polímero de superficie activa es una sustancia que disminuye la tensión superficial de un líquido o la tensión interfacial entre dos fases y por consiguiente permite o facilita la formación de una dispersión o es capaz de actuar como un solubilizador. Sorprendentemente, se encontró que utilizando dicho polímero en combinación con un ion de metal a alta osmolaridad podría lograrse un incremento significativo en la producción en la expresión de proteínas secretadas en células que tienen una pared celular. En particular, el polímero es un polímero de superficie activa, soluble en agua, no iónico. Preferentemente, el polímero no tiene un efecto desnaturalizante en las proteínas. Los ejemplos son polímeros o copolímeros seleccionados de entre poliéteres tales como polialquilglicoles, polisorbatos o polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, derivados de celulosa solubles en agua tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa, copolímero de vinilpirrolidona-acetato de vinilo (copovidonas), acetato de polivinilo, alcohol de polivinilo parcialmente hidrolizado, copolímeros de alcohol de polivinilo-polietilenglicol y mezclas de los mismos.

Preferentemente, la proporción de oxígeno de carbonilo ($O=R_1$) y/u oxígeno de éter (R_1-O-R_2) presentes en el polímero es por lo menos de un 1% en peso del peso molar del polímero. Sin limitarse por alguna teoría específica, parece que la presencia de dichos grupos de oxígeno en el polímero lleva a la estabilización de la célula, de modo que el medio que contiene sal que tiene alta osmolaridad es mejor tolerado y la productividad por consiguiente se puede incrementar. Preferentemente, la proporción de oxígeno de carbonilo y oxígeno de éter presentes en el polímero es por lo menos del 1.5% en peso, por lo menos del 2.5% en peso, o por lo menos 5% en peso, de manera particularmente preferida de por lo menos 10% en peso, por lo menos 15% en peso, por lo menos del 20% en peso o por lo menos 25% en peso. La proporción de oxígeno de carbonilo y oxígeno de éter presentes en el polímero preferentemente está comprendida entre 1% en peso y 50% en peso, preferentemente está entre 10% en peso y 42% en peso, en particular entre 5% en peso y 38% en peso, por ejemplo 36% en peso (solamente el oxígeno de éter) en polietilenglicol o 14.5% en peso (solamente el oxígeno de carbonilo) en PVP.

El poliéter preferentemente es un polímero o copolímero de un polialquilglicol, por ejemplo, copolímeros de polietilenglicol (PEG) o de polipropilenglicol u óxido de polietileno-polipropileno. El alquilo polimerizado también puede ser una mezcla de alquilenos individuales, por ejemplo, como en un poloxámero. El alquilo preferentemente se selecciona de entre alquilenos con C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 o mezclas de los mismos. Un polialquilglicol puede estructurarse según la fórmula $[-R-O-]_n$, en donde R representa el grupo de alquilo. Los grupos OH terminales, grupos de éster o éter pueden proporcionarse independientemente. Los grupos de éster o éter pueden seleccionarse independientemente de grupos con C_1 - C_8 , como se menciona anteriormente, o de cadenas orgánicas más largas, tales como por ejemplo C_9 - C_{18} . Los grupos de éster o éter pueden enlazarse a través de un grupo de enlace, preferentemente un grupo de enlace con C_1 - C_{12} , tal como por ejemplo un grupo arilo (por ejemplo, en octoxinol (Triton X-100) o nonoxinol). El poliéter o polialquilglicol preferentemente contiene por lo menos un grupo OH, preferentemente por lo menos 2 grupos OH, los cuales pueden ser grupos OH terminales.

El peso molecular del polímero de superficie activa, por ejemplo, PEG y similares, preferentemente por lo menos 500 Da, de manera particularmente preferida por lo menos 1,000 Da, por lo menos 1,500 Da, por lo menos 2,000 Da, por lo menos 3,000 Da, por lo menos 4,000 Da, por lo menos 6,000 Da, por lo menos 8,000 Da, por lo menos 10,000 Da, por lo menos 20,000 Da o por lo menos 30,000 Da. De manera particularmente preferida, el peso molecular está entre 500 Da y 2,000,000 Da, preferentemente entre 1,000 Da y 200,000 Da o entre 1,200 Da y 80,000 Da.

El polímero de superficie activa preferentemente está presente en una concentración de por lo menos 0.05% en peso, de manera particularmente preferida de por lo menos 0.08%, por lo menos 0.1% o por lo menos 1.5%, en el medio (todos los valores en % se refieren a % en peso).

En formas de realización particulares, las células se cultivan en un cultivo de suspensión o un cultivo hidropónico, en particular en un cultivo de raíces pilosas. Con el fin de incrementar su actividad secretoria, las células segregantes se tratan con el medio según la presente invención.

Con las células según la presente invención, la secreción en el medio ocurre en su mayor parte desde el espacio apoplástico de la célula. Para la secreción, opcionalmente en el espacio apoplástico, la proteína usualmente se expresa con una secuencia de señales para el espacio apoplástico o para la secreción. Las secuencias de señales adecuadas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, en la literatura mencionada en lo citado anteriormente, y se pueden utilizar según la presente invención.

El procedimiento según la presente invención es particularmente apto para incrementar la secreción de células que tienen una pared celular. Dichas células se pueden seleccionar de una célula vegetal, una célula de hongos o una célula de algas. El término "célula", que se utiliza en la presente memoria, se puede relacionar a células aisladas, células únicas o una célula en un organismo multicelular. Una célula de planta puede ser una célula de planta única o una célula en una planta o en un tejido vegetal. Análogamente, una célula fúngica puede ser una célula fúngica única o una célula en un hongo o en un tejido fúngico. La célula de algas preferentemente es una célula de algas verdes. Los tejidos, por ejemplo, se pueden seleccionar del floema, xilema, mesófilo, vástago, hojas, tallo, protonema, cloronema, caulonema, rizoides o gametóforos. Las células pueden comprender o consistir en protoplastos o células de parénquima, en particular células de callos.

La célula que va a utilizarse en el procedimiento según la presente invención preferentemente es una célula de planta, preferentemente obtenida de un musgo, en particular seleccionado de entre el grupo que consiste en musgos y hepáticas, en donde el uso de especies del género *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* y *Ceratodon*, así como *Marchantia* y *Sphaerocarpus*, respectivamente, es particularmente preferida. Más preferentemente, el procedimiento según la presente invención se lleva a cabo con el uso de células, plantas o tejido vegetales, tal como el protonema del musgo *Physcomitrella patens*. Las plantas aún más preferidas son el tabaco, frijoles o lentejas. Preferentemente, la planta es una planta acuática, por ejemplo, del género *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* o *Wolffiella*.

Según una forma de realización preferida adicional de la presente invención, la célula se cultiva en un medio de cultivo que esencialmente está libre de azúcares, vitaminas y fitohormonas o fragmentos funcionales de los mismos. Los ejemplos de fitohormonas adecuados son hormonas de crecimiento, tales como, por ejemplo, las auxinas.

Preferentemente, el procedimiento según la presente invención se lleva a cabo bajo condiciones de crecimiento fotoautotrófico. El procedimiento según la presente invención facilita el cultivo de plantas completas y diferenciadas, células vegetales o algas bajo condiciones fotoautotróficas estandarizables, es decir sin la necesidad de azúcares, vitaminas, fitohormonas y similares.

Básicamente, por supuesto también es posible utilizar azúcar, vitaminas o fitohormonas, en particular en medios para células fúngicas que no tengan la capacidad de crecimiento fotoautotrófico. En caso de células fúngicas, deberá proporcionarse una fuente de carbón catabólico. Debido a las propiedades autotróficas de las células, el medio puede estar libre de proteínas. Preferentemente, el medio es un medio esterilizado, con el fin de reducir el peligro de infección. El medio también se puede suplementar con un agente antibiótico con el fin de proteger la respectiva célula de patógenos que afecten tal célula.

El valor del pH del medio de cultivo preferentemente está entre 3.5 y 8.5, en particular preferentemente entre 4 y 8 o entre 4.5 y 7 o entre 5 y 6.5, en particular entre 5.5 y 6, por medio de lo cual el valor del pH se optimiza para su crecimiento o condiciones de expresión óptimos.

Con el fin de asegurar el crecimiento óptimo o una producción de proteínas incrementada, el medio deberá contener micronutrientes para las respectivas células, en particular sustancias minerales. El medio preferentemente comprende iones de nitrato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.2 mM, de iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, de iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, de iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, de iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, o combinaciones de los mismos. El medio también puede contener iones de sodio, preferentemente en una concentración de por lo menos 20 mM.

En formas de realización específicas de la presente invención, el procedimiento comprende adicionalmente otra etapa que se lleva a cabo antes de la etapa antes mencionada del (incremento) de la secreción de la proteína recombinante en el medio antes mencionado. En la etapa anterior, las células se hacen crecer en un medio de cultivo que tiene una osmolaridad menor a 0.1 osmol/l, en particular sin (incremento de) la secreción antes mencionada, mediante lo cual la proteína se acumula en el interior o en el espacio apoplástico de las células. En particular, la etapa anterior mejora la expresión de la proteína, incluso si la secreción de estas proteínas no se incrementa bajo las condiciones. Por medio de la siguiente etapa de (incremento de la) secreción, como se describe anteriormente, por último, es posible secretar y cosechar las proteínas producidas en cantidades incrementadas sin destruir la célula. Este procedimiento de dos etapas facilita un incremento considerable en la producción.

El medio de cultivo en la etapa anterior básicamente puede tener la misma composición que el medio de cultivo en la etapa de secreción – no obstante, con una osmolaridad más baja debido a la concentración más baja de los iones de metal. El medio de cultivo en la etapa precedente contiene – de manera análoga a o independientemente de la composición del medio en la etapa de secreción – iones de nitrato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.2 mM, de iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, de iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, de iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, de iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, o combinaciones de los mismos, facilitando así el crecimiento celular óptimo. La concentración máxima de los iones de sodio es de 20 mM, de manera particularmente preferida es de 15 mM o 10 mM.

El medio de cultivo en la etapa anterior preferentemente está libre de polímero de superficie activa o contiene este último en una concentración máxima de 0.08% en peso o 0.01% en peso o 0.005% en peso.

En la etapa anterior, el medio de cultivo también puede estar esencialmente libre de azúcares, vitaminas o fitohormonas o fragmentos funcionales de los mismos, aunque puede contener estas sustancias en formas de

realización alternativas. El medio de cultivo puede ser ya estéril o contener un agente antibiótico. El valor del pH del medio de cultivo en la etapa anterior preferentemente está entre 3 y 8, de manera particularmente preferida entre 3.5 y 7, o entre 4 y 6.5, o entre 4.1 y 6, en particular entre 4.2 y 5.5.

Preferentemente, las células son tratadas con gas en el medio de cultivo de la etapa anterior y/o en la etapa de secreción, en particular con aire u oxígeno. El gas utilizado para el tratamiento preferentemente contiene dióxido de carbono. La proporción de dióxido de carbono en el gas preferentemente está entre 0 y 10% en volumen, de manera particularmente preferida entre 1 y 9% en volumen o entre 1.5 y 8% en volumen, de manera particularmente preferida entre 1.7 y 5% en volumen. El dióxido de carbono sirve como una fuente de carbón para plantas y deberá proporcionarse en condiciones fotoautotróficas.

La temperatura en la etapa anterior y/o en la etapa de secreción preferentemente está entre 10°C y 30°C, de manera particularmente preferida entre 15°C y 26°C.

La irradiación de luz, que se mide en densidad de flujo de fotones (en μE), preferentemente está entre 1 y 3,000, en particular entre 100 y 2,200.

La etapa anterior puede llevarse a cabo durante un periodo de 2 a 30 días. Dentro de este periodo de tiempo, tendrá lugar una producción optimizada de la proteína recombinante.

La etapa de (incremento de la) secreción puede llevarse a cabo durante un periodo de por lo menos 2 días, preferentemente durante 3 a 120 días. Dentro de este periodo de tiempo, tendrá lugar una secreción optimizada de las proteínas recombinantes, que se producen previamente o en esta etapa.

El procedimiento de dos etapas se basa en la cultivación semi-continua del cultivo de células vegetales y consiste en la inoculación de las células vegetales en un medio de cultivo, la incubación con parámetros físicos específicos y la adición de un número de componentes para el medio durante el proceso. En el transcurso del proceso, las proteínas son secretadas en un momento definido desde el espacio apoplástico hacia el sobrenadante de cultivo alterando las condiciones del medio.

El procedimiento según la presente invención usualmente, aunque no de manera necesaria – se inicia con la inoculación de las células (por ejemplo 0.1 g/l de la biomasa seca) en sistemas de biorreactores adecuados (reactor de ondas, quimiostato, reactor de tubos, matraz de agitación etc.) que contiene el medio, así como la producción de biomasa de hasta una densidad celular definida (por ejemplo 1 a 3 g/l). Al incrementar la osmolaridad, por ejemplo, mediante la adición del ion de metal y el polímero (en donde en la mayoría de los casos el polímero no solo causa un incremento, sino que con frecuencia incluso una disminución en la osmolaridad), se inicia la secreción. En ambas de estas etapas, las células producirán y expresarán la proteína. El procedimiento según la presente invención arbitrariamente es escalable y puede emplearse en varios reactores y cantidades. Son posible biorreactores muy pequeños (placas de microtitulación), matraces de agitación, quimiostatos de 5 L, reactores de tubos de 100 L y biorreactores de ondas (10 L a 500 L).

La presente invención se refiere además a un medio de cultivo que se describe anteriormente, por ejemplo, que comprende el polímero de superficie activa en una cantidad de por lo menos 0.05% en peso y iones de metales monovalentes en una concentración de por lo menos 20 mM y que tienen una osmolaridad de por lo menos 0.32 osmol/l. El medio de cultivo es apto para el procedimiento descrito anteriormente y puede emplearse en el mismo, en particular en la etapa de (incremento de la) secreción.

El medio de cultivo preferentemente comprende iones de nitrato preferentemente en una concentración de por lo menos 0.2 mM, de iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, de iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, de iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, de iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, o combinaciones de los mismos. El medio preferentemente comprende iones de sodio, preferentemente en una concentración de por lo menos 40 mM, o por lo menos 60 mM, o por lo menos 80 mM.

La presente invención también se refiere a una mezcla de medio nutricional seco para reconstituir el medio de cultivo que se describe anteriormente. Mediante la adición de agua, la mezcla de medio nutricional puede producir las cantidades antes mencionadas y las concentraciones del medio de cultivo. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir el medio de cultivo mediante la disolución de los ingredientes en un solvente acuoso, preferentemente en agua.

La presente invención se ilustra además mediante las siguientes Figuras y Ejemplos, sin limitarse a estas formas de realización específicas de la presente invención, por el contrario.

Figuras:

La Figura 1 muestra los efectos sinérgicos de un incremento en la osmolaridad mediante la adición de NaCl y

el polímero PEG en la secreción de un anticuerpo producido recombinantemente;

La Figura 2 muestra los efectos adicionales que incrementan la producción de las sustancias minerales para fomentar el crecimiento de las plantas (nitrato de Ca);

La Figura 3 muestra los efectos de las diferentes concentraciones del polímero.

Ejemplos:

La presente invención proporciona un procedimiento que permite la secreción continua de proteínas recombinantes de cultivos de plantas en el medio de cultivo. En el procedimiento, las plantas de producción se sumergen en un cultivo líquido y se cultivan foto-autotróficamente en medios minerales específicos. Los medios de cultivo se optimizan con respecto a un mantenimiento nutricional óptimo de plantas de musgos, aunque no *per se* debido a la secreción de proteínas más grandes recombinantemente producidas en el medio, cuyas proteínas primero se acumulan en el apoplasto y se pueden medir como "intracelulares" después de la alteración del tejido del musgo.

La limitación apoplástica de las proteínas se puede revertir mediante la adición de sustancias osmóticamente activas ("componentes de secreción"), tal como NaCl y polietilenglicol (PEG) 4000, al medio de cultivo. Esto conlleva una rápida liberación de las proteínas acumuladas en el medio y en el transcurso posterior del cultivo a una secreción continua y temporalmente inmediata de proteínas recién sintetizadas.

Ejemplo Experimental: Comparación de la secreción de proteínas en cultivos en Erlenmeyer

Se rellenaron matraces Erlenmeyer de 500 ml con 180 ml de medio Knop o WM01 estéril, ajustado a pH de 4.5 a 6 (amortiguador de 2-(N-morfolino)etansulfónico, "MES") y se inocularon con un cultivo de suspensión recién homogeneizado en un aparato Ultra-Turrax de protonema de *Physcomitrella* de una cepa recombinante producida mediante una proteína de prueba. La densidad de inoculación fue de 0.1 g en peso seco/l. Los cultivos se sellaron de manera estéril y permeable al gas y se cultivaron en una atmósfera suplementada con CO₂ al 2%. Al crecer a una densidad celular de 1 a 3 g/l, los componentes de la secreción se agregaron en la forma de un concentrado estéril. Durante el procedimiento de cultivo, se determinaron los parámetros de densidad de cultivo (g de peso seco/l), titulación de IgG intracelular y extracelular (mg/l) a intervalos regulares.

Resultados:

Se produjeron las siguientes proteínas de prueba:

Tabla 1: Proteínas de prueba secretadas

Proteína	Peso molecular [kDa]	Secreción c/o medio de secreción	Secreción con medio de secreción (NaCl, PEG)
IgG	145	no	si
Alfa-Galactosidasa	80	no	Si
VEGF ₁₂₁	50	si	si
Epo	30	si	si
HSA	67	si	Si

Tabla 2: Medios (todas las concentraciones dadas en mg/l. *excepto para el MES):

	1	2	3	4	5	6
Medio nutric.	KNOP	1/10 KNOP	BM	WM01	Murashige & Skoog	Linsmaier & Skoog
KH ₂ PO ₄	250	25	250	500	170	170
NH ₄ NO ₃					1650	1650
KNO ₃					1900	1900
KCl	250	25	250	500		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	25	250	500	180.7	
Ca(Na ₃) ₂ x 4H ₂ O	1000	100	1000	2000		
CaCl					332.2	332.2
NaCl						
MES *			5 mM	5 mM		

Además, pueden agregarse microelementos tales como H₃BO₃, FeSO₄, Fe-NaEDTA, COCl₂, CuSO₄, KI, MnCl₂, Na₂MoO₄, NiCl₂, Na₂SeO₃, acetato de Zn, o vitaminas tales como ácido fólico, mio-inositol, ácido nicotínico, HCl de tiamina, HCl de piridoxina, biotina o también glicina. Para cultivos fúngicos, se agrega una fuente adicional de carbohidratos catabólicos tal como glucosa, manosa o manitol.

Ejemplo 1: Incremento en la producción por medio de PEG y una osmolaridad incrementada

Un anticuerpo IgG se expresó como se describe en *P. patens* utilizando los siguientes parámetros: alternancia de luz [h] 16/8, medio inicial KNOP, temperatura 22°C, contenedor del cultivo: matraz; medio "KNOP NaCl 1/10" que contiene 100 mM de NaCl además del medio "KNOP 1/10". El medio "KNOP PEG" y "KNOP NaCl PEG 1/10", respectivamente, que contiene 4.8% en peso de PEG-4000 además del medio "KNOP" y "KNOP NaCl 1/10", respectivamente. Los resultados de la producción de anticuerpos después de 6 semanas se representan en la Tabla 3 y en la Fig. 1.

Tabla 3: PEG y NaCl (100 mM para el incremento en la osmolaridad)

	intracelular	extracelular	extra/total
Matraz	ng de IgG/mg de peso seco	ng de IgG/mg de peso seco	%
Knop, Experimento 1	62.3	4, 8	7%
Knop, Experimento 2	88.5	6, 6	7%
Knop, Experimento 3	84.1	6, 4	7%
Promedio	78.3	5.9	7%
Knop NaCl 1/10, Experimento 1	27.3	29.7	52%
Knop NaCl 1/10, Experimento 2	24.0	30.8	56%
Knop NaCl 1/10, Experimento 3	19.5	43.1	69%
Promedio	23.6	34.5	59%
Knop PEG, Experimento 1	35, 9	4.3	11%
Knop PEG, Experimento 2	25.0	4.5	15%
Knop PEG, Experimento 3	33.1	4.5	12%
Promedio	31.4	4.4	13%
Knop NaCl 1/10, PEG, Experimento 1	27.7	180.7	87%
Knop NaCl 1/10, PEG, Experimento 2	30.1	175.3	85%
Knop NaCl 1/10, PEG, Experimento 3	36.2	208.2	85%
Promedio	31.3	188.1	86%

Con la combinación de NaCl y PEG se observó un incremento en la productividad y secreción que excedía por mucho los respectivos efectos del NaCl solo y PEG solo. Por consiguiente, es claramente obvio un efecto sinérgico.

Ejemplo 2: Incremento en la producción por medio de PEG y una osmolaridad incrementada y nitrato

Una cadena lambda de un anticuerpo IgG1 se expresó como se describe en *P. patens* utilizando los siguientes parámetros: alternancia de luz [h] 16/8, medio inicial KNOP, temperatura 25°C, intensidad de luz 40 µE/m²s, contenedor del cultivo: matraz; los resultados de la producción de anticuerpos después de diferentes intervalos de tiempo se representan en la Tabla 4 y en la Fig. 2.

Tabla 4: PEG, NaCl (osmolaridad) y nitrato (concentración de IgG1 en µg/ml)

Día de cultivo	7	14	21	28
Medio de KNOP 100 mM de NaCl 1/10 +	0.279	0.239	0.053	0.059
Medio KNOP + 100 mM de NaCl 1/10, 4.8% de PEG, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de calcio	1.719	8.947	8.882	10.872
Medio KNOP + 50 mM de NaCl 1/10, 4.8% de PEG, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de calcio	0.717	5.04	6.125	7.001
Medio KNOP + sin NaCl 1/10, 4.8% de PEG, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de calcio	0.048	0.086	0.123	0.122
1/10 + Medio de 100 mM de NaCl KNOP, 4.8% de PEG	0.19	2.248	2.363	0.494
1/10 + medio de 100 mM de NaCl KNOP, 4.8% de PEG, 48 mM de manitol	0.214	2.041	1.453	0.213
1/10 + medio de 100 mM de NaCl KNOP, 4.8% de PEG, 12 mM de nitrato de calcio	0.578	6.574	8.226	11.83
1/10 + medio de 100 mM de NaCl KNOP, 48 mM de manitol	0.043	0.132	0.12	0.088
1/10 + medio de 100 mM de NaCl KNOP, 12 mM de nitrato de calcio	0.159	1.027	3.715	4.606
Medio KNOP + 100 mM de NaCl 1/10, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de calcio	0.185	1.259	3.704	5.087

Según estos resultados, el manitol no tiene influencia en el comportamiento de la secreción. El nitrato es ventajoso debido al crecimiento mejorado de la planta. En experimentos adicionales, los iones de potasio, fosfato, sulfato, o

calcio, dentro de un intervalo de 1 a 10 mM, también mostraron efectos positivos que se basan en un crecimiento mejorado de la planta. En estas concentraciones bajas y sin un incremento significativo en la osmolaridad no podría observarse un efecto en la secreción.

5 Ejemplo 3: Diferentes polímeros y concentraciones de los polímeros

Una cadena lambda de un anticuerpo IgG1 se expresó como se describe en P. patens utilizando los siguientes parámetros: alternancia de luz [h] 16/8, medio inicial KNOP/BM, temperatura 25°C, intensidad de luz 40 µE/m2s, contenedor del cultivo: matraz; los resultados de la producción de anticuerpos después de diferentes intervalos de tiempo se representan en las Tablas 5 y 6 y en la Fig. 3.

Tabla 5: Composición del medio y producción de IgG (concentraciones en mM)

Medio	1	2	3	4	5	6
iones de magnesio	0.1014	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
iones de calcio	12.4235	14.09	14.09	14.09	14.09	14.09
ion de cloruro	100	100	100	100	100	100
iones de sulfato	0.1059	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
iones de nitrato	24.847	28.185	28.185	28.185	28.185	28.185
iones de potasio	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
iones de sodio	100	100	100	100	100	100
iones de fosfato	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
MES	0	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705
Manitol	48	48	48	48	48	48
PEG [%] p/v	4.8	4.8	1	0.5		
pH	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
Tween 20 [p/v]					0.05	0.01

Tabla 6: Resultados de la producción IgG en µg/ml

Medio No.	7 d	14 d	21 d
1	1.26	2.98	5.43
2	1.75	5.01	7.2
3	2.05	5.95	8.66
4	1.85	5.61	8.42
5	0.41	0.46	0.57
6	1.88	7.13	14.9

Sobre la base de estos resultados se puede concluir que las bajas concentraciones de PEG no tienen una influencia negativa en la secreción en la presencia de PEG. El efecto de Tween es más fuerte en concentraciones más bajas (medio 6) que en concentraciones altas (medio 5).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una proteína recombinante en células vegetales con una pared celular, que comprende la etapa de secreción de la proteína recombinante a través de la pared celular mediante la expresión de la proteína en las células vegetales en un medio de cultivo que contiene una combinación de un polímero de superficie activa y unos iones de metal monovalente y con una osmolaridad de por lo menos 0.32 osmol/l.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la secreción en el medio se produce desde el espacio apoplástico de la célula.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la célula vegetal es una célula en una planta o en un tejido vegetal, siendo particularmente preferida una célula de musgo.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la célula es cultivada en un cultivo de suspensión.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el ion de metal es un ion de metal alcalino, preferentemente sodio, y/o el ion de metal está presente en el medio en una concentración de por lo menos 20 mM.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el polímero de superficie activa es un polialquilglicol, preferentemente polietilenglicol, y/o el polímero de superficie activa está presente en el medio en una concentración de por lo menos 0,05 % en peso en un medio.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el medio de la etapa (b) comprende iones de nitrato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.2 mM, iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, iones de sodio, preferentemente en una concentración de por lo menos 20 mM o combinaciones de los mismos.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que, antes de dicha etapa de secreción de la proteína recombinante en dicho medio, las células se dejan crecer en una etapa anterior en un medio de cultivo que presenta una osmolaridad inferior a 0,1 osmol/l, en particular sin dicha secreción, de manera que la proteína se acumule en el interior de las células o en el espacio apoplástico de las células.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que el medio de cultivo en dicha etapa anterior comprende iones de nitrato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.2 mM, iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, o combinaciones de los mismos; y/o iones de sodio en una concentración de como máximo 20 mM.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que el medio de cultivo en dicha etapa anterior no comprende el polímero de superficie activa o lo comprende en una concentración de como máximo 0.08% en peso.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que dicha etapa anterior se lleva a cabo durante un periodo de 2 a 30 días.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que dicha etapa de secreción se lleva a cabo durante un periodo de por lo menos 2 días, preferentemente de 3 a 120 días.
13. Medio de cultivo apto para fomentar la secreción de acuerdo con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende el polímero de superficie activa en una cantidad de por lo menos 0,05 % en peso y unos iones de metal monovalente en una concentración de por lo menos 20 mM y con una osmolaridad de por lo menos 0,32 osmol/l.
14. Medio de cultivo según la reivindicación 13 que comprende iones de nitrato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0,2 mM, iones de fosfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.05 mM, iones de sulfato, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.02 mM, iones de calcio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, iones de potasio, preferentemente en una concentración de por lo menos 0.1 mM, iones de sodio, preferentemente en una concentración de por lo menos 40 mM, o combinaciones de los mismos.
15. Mezcla seca de medio nutricional para la reconstitución del medio de cultivo según la reivindicación 13 o 14.

Fig. 1

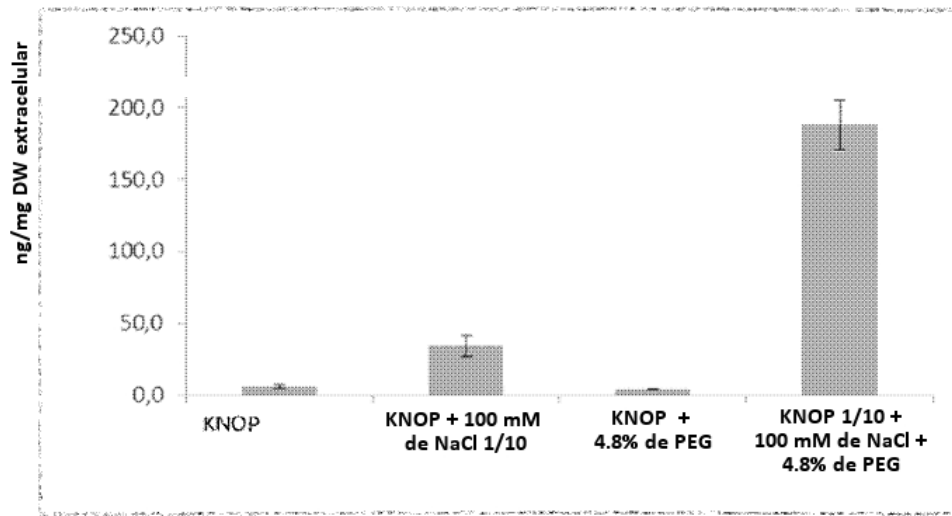


Fig. 2

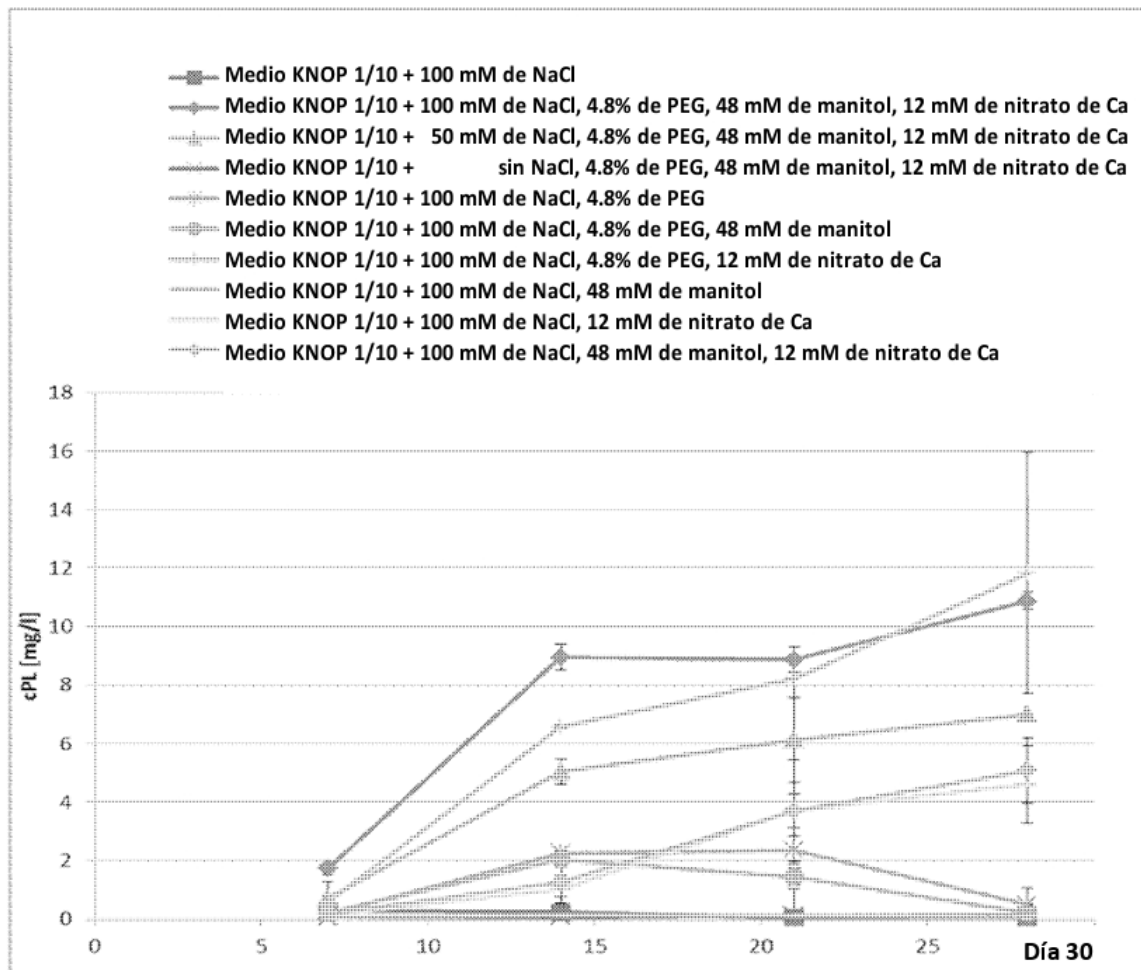


Fig. 3

