

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 001**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2007 PCT/US2007/016917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2008 WO08013943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2007 E 07836299 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2061897**

54 Título: **Procedimiento de fermentación de alimentación discontinua de alta densidad celular para producir proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

27.07.2006 US 833479 P

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

20.10.2020

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**SUN, WEI-QIANG WILLIE y
PURSELL, EARL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 788 001 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 fermentación de alimentación discontinua de alta densidad celular para producir proteínas recombinantes

5

Campo de la Invención

La presente solicitud se refiere en general a procedimientos de fermentación de alimentación discontinua novedosos que proporcionan expresión de proteínas mejorada en sistemas bacterianos.

10

Antecedentes de la Invención

Se han utilizado varias estrategias de fermentación para producir proteínas en cantidades suficientes para uso de laboratorio, clínico o comercial. Se ha utilizado la fermentación de alimentación discontinua para proporcionar rendimiento de proteínas incrementados sobre aquellos proporcionados por los procedimientos de fermentación por lotes únicos. La fermentación de alimentación discontinua es un procedimiento en el que, después de una fase por lotes inicial, tiene lugar una fase en la que uno o más nutrientes se suministran al cultivo mediante alimentación.

15

De manera general, durante la fase por lotes, se hace crecer inicialmente las células a una concentración deseada. En esta fase, el crecimiento celular se amplifica y generalmente no se producirán proteínas objetivo a menos que uno agregue un inductor, tal como arabinosa, lactosa o beta-D-tiogalactosida isopropilo (IPTG), dependiendo del promotor, o hay algún escape del promotor. Durante la fase de alimentación, la fuente de carbono y otros requerimientos alimentan típicamente un fermentador en una corriente líquida relativamente concentrada en una cierta velocidad de alimentación. Una vez se alcanza una densidad celular objetivo, se inicia una alimentación con el inductor o el inductor y otros nutrientes. En esta fase, el énfasis es sobre la producción de proteína por las células en crecimiento. El sustrato (que son, los nutrientes y el inductor) que alimenta el fermentador se utiliza en esta etapa generalmente para crecimiento celular y síntesis del producto. El crecimiento celular se controla por la velocidad de alimentación para obtener una producción de proteína y crecimiento celular óptimos. Durante la etapa de producción de proteína, se debe agregar un inductor para organismos recombinantes.

20

25

30

La expresión de proteína sobre un medio que comprende una fuente de carbono común tal como fuente de carbón basada en glucosa u otro azúcar y un inductor es satisfactorio hasta que surgen condiciones limitantes al final de la fase de alimentación. Ejemplos de condiciones limitantes incluyen la concentración y oxígeno reducido, nutrientes reducidos tal como vitaminas, carbón, nitrógeno y acumulación de compuestos tóxicos en el medio de crecimiento.

35

Las estrategias de fermentación de alimentación discontinua frecuentemente implica diferentes formas de control de retroalimentación, que incluyen la retroalimentación directa e indirecta para controlar el suministro de nutrientes. Uno de tales procedimientos de fermentación de alimentación discontinua implica la aplicación de un algoritmo de control de retroalimentación al alimentar los nutrientes con el fin de controlar un parámetro de procedimiento en un punto establecido definido. Por ejemplo, el control directo de la alimentación se puede pasar en la medición de la concentración de nutrientes. El control de retroalimentación se relaciona luego directamente con la actividad celular a través de la fermentación. Los parámetros de control que se han utilizado para el control de retroalimentación de fermentación incluyen valor del pH, densidad celular medida en línea o tensión de oxígeno disuelto (DOT).

40

45

Sin embargo, la aplicación de los algoritmos de retroalimentación se acompaña de un número de desventajas. Una de tales desventajas es que la velocidad de alimentación depende de los parámetros de procedimiento actuales. Cualquier interrupción al procedimiento puede afectar el parámetro distorsionando así la velocidad de alimentación y el rendimiento de proteína resultante. Tales desventajas se magnifican cuando el procedimiento se hace a gran escala para producir mayores cantidades de proteínas.

50

Otra desventaja de las estrategias de fermentación de alimentación discontinua empleadas previamente es que cuando se utiliza el control de retroalimentación, la velocidad de crecimiento específica no se puede controlar o predefinir exactamente, resultando en rendimientos subóptimos en procedimientos, en el que la formación de productos es dependiente del crecimiento.

55

Adicionalmente, cuando el flujo de carbón (por ejemplo, alta concentración de glucosa) en la ruta metabólica central excede la capacidad máxima del ciclo de Ácido Tricarboxílico (TCA), se pueden acumular subproductos. La acumulación de subproductos puede inhibir el crecimiento celular y la producción de proteína durante la fermentación.

60

Adicionalmente, las varias deficiencias de los procedimientos de fermentación de alimentación discontinua frecuentemente resultan en uso ineficiente de componentes nutrientes. Como tal, los procedimientos pueden ser económicamente desventajosos, particularmente para la producción de proteína comercial a gran escala.

65

Los enfoques previos para la expresión de proteínas recombinantes a través de la fermentación de alimentación

discontinua, como se describió anteriormente, tiene varias deficiencias. Dada la importancia de producir cantidades de proteínas suficientes efectivas en costos para varios propósitos, subsiste la necesidad de un procedimiento de fermentación de alimentación discontinua eficiente que resulte en mayor crecimiento celular, formación de producto incrementado (esto es, mayor rendimiento de proteína), y acumulación de subproductos reducida.

El documento de patente WO 2005/089182 A2 divulga procedimientos de fermentación para producir péptidos y proteínas recombinantes preferentemente en *E. coli* mediante la adición simultánea o separada de una fuente de carbono y un inductor, por ejemplo, IPTG o lactosa, en el que el inductor se agrega en una cierta proporción a la fuente de carbono, lo que constituye un parámetro umbral.

El documento de patente WO 01/32890 A1 menciona un procedimiento de fermentación para producir L-pantolactonhidrolasa recombinante en *E. coli* mediante la alimentación continua de nutrientes y la adición continua de inductores, entre otros, arabinosa, después de alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6 o 4,1.

Han Se Jong et al., "Characterization of an oxygen-dependent inducible promoter, the nar promoter of *Escherichia coli*, to utilize in metabolic engineering", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 72, no. 5, marzo de 2001, páginas 573-576 divulga el uso del promotor inducible dependiente de oxígeno "nar" para aumentar la producción de productos químicos valiosos, por ejemplo, proteína β-galactosidasa, bajo el control del promotor nar, que es inducida por la reducción de los niveles de oxígeno disuelto. Las células de *E. coli* se cultivan como un cultivo de alimentación discontinua con glucosa como fuente de carbono en condiciones de alimentación exponencial y se inducen a una OD₆₀₀ de 35.

Strieder G. et al., "Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 19, no. 5, septiembre de 2003, páginas 1427-1432 se refiere a procedimientos para 'ajustar' la expresión de genes recombinantes, ejemplificados por la expresión inducible de la proteína modelo superóxido dismutasa humana Cu/Zn (hSOD), que corresponde a un gen del serogrupo B de *N. meningitidis*, bajo el control de un promotor inducible por IPTG o lactosa. Las células se cultivaron en un medio que contenía glucosa en modo de alimentación discontinua. Se aplica un régimen de alimentación exponencial combinado de sustrato e inductor, en el que la alimentación del inductor se inicia un tiempo doble después de la alimentación del sustrato, es decir, cuando se ha alcanzado un cierto umbral de densidad óptica.

Wong H. H. et al., "Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 60, no. 3, 5 de noviembre de 1998, páginas 271-276 compara los efectos de diferentes estrategias de alimentación de nutrientes post-inducción en la producción de proteínas recombinantes usando un sistema de expresión inducible IPTG en *Escherichia coli*. La producción de proteínas es inducida por la adición de IPTG a una OD₆₀₀ de 100.

Gavit P. et al., "Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 79, no. 2, 1 de abril de 2000, páginas 127-136 se refiere a la producción de una proteína de fusión recombinante en *E. coli*, en el que el cultivo bacteriano es inducido por una adición de arabinosa (60 g/l) después de alcanzar una densidad celular óptica de aproximadamente 100.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a procedimientos de fermentación de alimentación discontinua novedosos para producir altos rendimientos de proteínas recombinantes de forma inesperada.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende: cultivar una célula bacteriana recombinante para expresar una proteína recombinante que comprende agregar continuamente una fuente de carbono a un cultivo que comprende una célula bacteriana recombinante y agregar continuamente un inductor al cultivo después de que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110; y aislar la proteína recombinante del cultivo, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo.

Una realización adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende: (a) introducir en la célula huésped bacteriana un vector de expresión que codifica una proteína recombinante bajo el control de un promotor inducible para formar una célula bacteriana recombinante; (b) introducir la célula bacteriana recombinante dentro de un medio de cultivo para formar un cultivo celular (c) agregar una fuente de carbono al cultivo celular como una alimentación continua; (d) monitorear el crecimiento celular en el cultivo celular para alcanzar una densidad óptica umbral (OD₆₀₀); (e) agregar un inductor del promotor inducible al cultivo celular como una alimentación continua una vez que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del

inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo; y f) aislar la proteína recombinante del cultivo celular.

5 Todavía una realización adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende: cultivar una célula bacteriana recombinante para expresar una proteína recombinante al agregar continuamente un inductor a un cultivo que comprende una célula bacteriana después de que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, en el que la célula bacteriana comprende una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a un gen del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo.

15 De acuerdo con aún una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína 2086 recombinante (rP2086) que comprende (a) introducir en una célula huésped bacteriana un vector de expresión que codifica una proteína 2086 meningocócica recombinante bajo el control de un promotor inducible para formar una célula bacteriana recombinante; (b) introducir la célula bacteriana recombinante a un medio de cultivo para formar un cultivo; (c) agregar una fuente de carbono al cultivo; (d) monitorear el crecimiento celular en el cultivo para el alcance de una densidad óptica umbral (OD); (e) agregar continuamente un inductor del promotor inducible al cultivo una vez la densidad celular del cultivo alcanza una densidad óptica de aproximadamente 70 a 110; y (f) cosechar la proteína 2086 meningocócica recombinante del cultivo después de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas después del inicio de agregar continuamente el inductor.

25 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende: un cultivo bacteriano que comprende una proteína 2086 recombinante (rP2086) en una densidad de por lo menos aproximadamente 1,5 g/l en función del volumen total del cultivo bacteriano.

30 De acuerdo con aún otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende: un medio de cultivo bacteriano que comprende una proteína 2086 meningocócica recombinante (rP2086) preparada de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

35 La(s) referencia(s) a la(s) "realización(es)" a lo largo de la descripción que no están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas simplemente representan posibles ejecuciones ejemplares y, por lo tanto, no son parte de la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

40 Figura 1: Fermentación de alimentación discontinua en varias velocidades de alimentación constantes sin inducción.

Figura 2: Fermentación de alimentación discontinua en varias velocidades de alimentación constantes sin inducción.

45 Figura 3: Inducción en varias densidades ópticas.

Figura 4: Inducción con varios niveles de arabinosa.

Figura 5: Efectos del procedimiento de adición de arabinosa sobre el rendimiento de rLP2086.

50 Figura 6: Efecto de la velocidad de alimentación de arabinosa sobre la producción de rLP2086.

Figura 7: Efecto de tiempo de inducción sobre la expresión.

55 Figura 8: Fermentación de alimentación discontinua para la producción de rLP2086 de la subfamilia B.

Figuras 9a y 9b: SDS-PAGE y Transferencia Western de inducción de rLP2086 de la subfamilia B, respectivamente.

60 Figura 10: Fermentación de alimentación discontinua para la producción de rLP2086 de la subfamilia A.

Figura 11a y 11b: SDS-PAGE y Transferencia Western de inducción de rLP2086 de la subfamilia A, respectivamente.

65 Figura 12a, 12b y 12c: Alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la inducción.

Figura 13a: Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia B de *E. coli* a escala de 100 l.

5 Figura 13b: Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia A de *E. coli* a escala de 100 l.

Figura 14a: Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia B de *E. coli* con alimentación dual de glucosa y arabinosa a escala 100 l.

10 Figura 14b: Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia A de *E. coli* con alimentación dual de glucosa y arabinosa a escala 100 l.

Descripción detallada de la invención

15 Los procedimientos de la presente invención se basan en el descubrimiento sorprendente que se obtienen altos rendimientos de proteína inesperadamente mediante la fermentación de alimentación discontinua con alimentación continua de un inductor durante la inducción en un medio de cultivo. Opcionalmente, una fuente de carbono se alimenta continuamente antes y/o durante la alimentación continua del inductor. Cuando se induce por arabinosa, aproximadamente 2-3g/l de una lipoproteína 2086 recombinante (rLP2086) (que se expresa por un microorganismo que tiene una secuencia que corresponde al gen 2086 en el serogrupo B de *N. meningitidis*) que se produce de acuerdo con una realización de la invención. Esto representa aproximadamente un incremento de 2-3 veces en el rendimiento del rLP2086 mediante fermentación de alimentación discontinua para ambas subfamilias A y B de la proteína 2086 comparado con un procedimiento de fermentación por lotes comparativo. Más aún, los procedimientos de la presente invención son fácilmente adaptables a producción a escala comercial de éstas y otras proteínas.

25 Para los propósitos de promover un entendimiento de las realizaciones descritas en la presente memoria, se hará referencia a varias realizaciones y se utilizará lenguaje específico para describir las mismas. La terminología utilizada en la presente memoria solo es para el propósito de describir realizaciones particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención. Como se utiliza a lo largo de esta descripción las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. De la misma manera, las formas singulares de los términos tal como "medio" incluye referencia al "medio" plural y viceversa. Así, por ejemplo, una referencia a "un medio de cultivo" incluye una pluralidad de tales medios, así como también un único medio; y una referencia a "medio de cultivo" incluye una pluralidad de medios, así como también un único medio.

35 El término "inductor", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier agente que induce, mejora o promueve la expresión de una proteína recombinante, con lo cual la expresión del gen bajo el control del promotor inducible se puede regular directamente mediante la concentración de ese agente.

40 El término "fuente de carbono", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una fuente de carbono y energía para células.

45 El término "alimentación", "alimento", "que alimenta" o "agregar continuamente", como se utiliza intercambiamente en la presente memoria se refiere a agregar continuamente una sustancia durante un período de tiempo a diferencia de todo de una vez. Los términos contemplan una iniciación única y/o la terminación o múltiples inicios y/o puntos de parada para agregar continuamente la sustancia durante un procedimiento de fermentación.

50 El término "proteína recombinante" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier proteína o porción biológicamente activa de ésta (por ejemplo, una porción que retiene la actividad biológica de la proteína completa) que no es un gen marcador o indicador (por ejemplo, una proteína fluorescente verde) expresada a partir de aminoácidos que codifican material genético recombinante, que incluye péptidos, polipéptidos, proteínas, oligoproteínas y/o proteínas de fusión. Un producto de proteína recombinante puede incluir un producto terapéutico profiláctico o de diagnóstico.

55 Procedimientos de la presente invención

Los procedimientos de la presente invención proporcionan inesperadamente altos rendimientos de proteínas a través de un procedimiento de fermentación de alimentación discontinua novedoso que implica agregar continuamente el inductor tal como arabinosa, a un medio de cultivo después de que el cultivo alcanza un parámetro umbral. Una fuente de carbono, tal como glucosa se agrega generalmente a un cultivo que comprende una célula bacteriana recombinante antes de la fase de inducción. La fuente de carbono puede ser alimentada junto con el inductor. El inductor también puede servir como una fuente de carbono secundaria.

65 Una fuente de carbono, tal como glucosa, se agrega continuamente al medio de cultivo antes y/o durante la alimentación continua del inductor al medio de cultivo, de acuerdo con una realización de la presente invención. Así,

la alimentación continua de la fuente de carbono coincide con la alimentación continua del inductor, de acuerdo con una realización. La alimentación continua de la fuente de carbono puede continuar durante la alimentación continua del inductor o solo durante partes de esa duración. En otra realización, la alimentación continua de la fuente de carbono no coincide con la alimentación continua del inductor. De acuerdo con una realización de la presente invención, el inductor y/o la fuente de carbono puede alimentar el cultivo a una velocidad constante.

El procedimiento de fermentación de alimentación discontinua Implica varias etapas que resultan en la producción de la proteína deseada de acuerdo con una realización de la invención. En una etapa inicial, un vector de expresión que codifica un producto de proteína recombinante bajo el control de un promotor inducible se prepara y luego se introduce dentro de una célula huésped bacteriana. La célula huésped bacteriana se introduce dentro del medio de cultivo. Un inductor del promotor inducible alimenta el cultivo (esto es, el inductor se agrega dentro del cultivo continuamente durante un período de tiempo). El inductor puede alimentar el cultivo a una velocidad constante. Luego, el producto de proteína recombinante se cosecha del cultivo. La proteína recombinante producida de esta forma se puede purificar luego según se desea y/o se utiliza en cualquier forma adecuada tal como en una formulación profiláctica, terapéutica o para diagnóstico.

El rendimiento de proteína mejorado y alta densidad celular se alcanza inesperadamente mediante la fermentación de alimentación discontinua con la alimentación a velocidad constante de un inductor, que proporciona un rendimiento de producto de proteína recombinante de aproximadamente un incremento de 2-3 veces según se compara con la fermentación continua, como se ilustra en los ejemplos suministrados adelante. Los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar a la fermentación a gran escala, así como también a la fermentación a pequeña escala. La fermentación a "gran escala" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la fermentación en un fermentador que es por lo menos aproximadamente 1000 l de capacidad volumétrica, esto es, volumen de trabajo, dejando el cuarto adecuado para cámara de aire. La fermentación a "escala pequeña" se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que generalmente no es más de aproximadamente 100 l de capacidad volumétrica, tal como 5 l, 10 l, 50 l o 100 l. Una ventaja demostrada del actual procedimiento de fermentación de alimentación discontinua es que éste se puede utilizar para la producción de un producto de proteína recombinante en la escala de fermentador de 5-10 l y se puede escalar a cualquier volumen. Por ejemplo, 100 l, 150 l, 250 l, 500 l, 1000 l o más, sin limitación.

Inductores

Los procedimientos descritos en la presente memoria se relacionan con la producción de proteína recombinante en el que la expresión de la proteína recombinante está bajo el control transcripcional de un promotor inducible, con lo cual la expresión del gen bajo el control del promotor inducible se puede regular directamente mediante la concentración del inductor presente en el medio de cultivo. El inductor se proporciona continuamente a un medio de cultivo, opcionalmente a una velocidad constante. El inductor se agrega al medio de cultivo una vez se ha alcanzado un parámetro umbral. Por ejemplo, una proteína recombinante puede estar bajo el control de un inductor araB (por ejemplo, ParaB) que se puede regular directamente mediante la concentración de arabinosa que se agrega a una velocidad constante al medio de cultivo. Inductores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de inductores se proporcionan a continuación y sin limitación.

Promotor	Inductor
Promotor arabinosa, tal como,	Arabinosa
Plasminógeno humano ParaB	Factor de Necrosis Tumoral
Inhibidor Activador tipo 1, Hpai-1	(TNF)
Citocromo P-450	Toxinas
Elemento Sensible al Metal CYP1A1, MRE	Metales Pesados, Glucocorticoides
Virus de Tumor	Mamarios de Ratón
Colagenasa	Éster de Forbol
Estromolisina	Éster de Forbol
SV40	Éster de Forbol
Proliferina	Éster de Forbol
α-2-Macroglobulina	IL-6
Gen MX Murino	Interferón, Virus de la enfermedad de Newcastle
Vimectina	Suero
Estimulador de la Tiroides	Hormona Tiroidea
Gen de la Hormona α	HSP70 Ela, FMA T Grande SV40

	Factor de Necrosis Tumoral de Antígeno	
	Interferón	Infección Vírica, ARNs
5	Somatostatina	AMP Cíclico
	Fibronectina	AMP Cíclico
	Promotor/operador lac	IPTG

Fuente de carbono:

10
15
20
25

Cualquier fuente de carbono adecuada, por ejemplo, glicerol, succinato, lactato, o fuente de carbono basada en azúcar, por ejemplo, glucosa, lactosa, sacarosa y fructuosa, se contemplan para uso en la presente invención, como se entenderá por un experto en la técnica. Por ejemplo, fuentes de carbono basadas en azúcar que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, sin limitación, polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacáridos D-manosa, D- y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (por ejemplo, ácido polimanurónico, o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico que incluye homopolisacáridos y heteropolisacáridos por ejemplo, lactosa, amilopectina, almidón, almidón de hidroxietilo, amilasa, sulfato de dextrano, dextrano dextrinas, glicógeno, o la subunidad polisacárida de ácido mucopolisacárido, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tal como polisorbitol y polimantitol; heparina o heparán; o cualquier combinación de éstos, sin limitación. La glucosa es la fuente de carbono primaria de acuerdo con una realización de la invención. De acuerdo con una realización, las fuentes de carbono incluyen cualquiera de D-glucosa, sacarosa, l-inositol, D-manitol, β-D-fructosa, α-L ramnosa, D-xilosa, celulosa, o cualquier combinación de los mismos. En la presente invención, se puede utilizar una o más de una fuente de carbono.

Sistemas de Expresión Bacterianos y Plásmidos:

30

La invención también proporciona células bacterianas recombinantes que comprenden un vector de expresión, tal como un plásmido, que comprende una secuencia de control de expresión que tiene secuencias promotoras y secuencias iniciadoras y una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido deseado, la secuencia de nucleótido se ubica en 3' para el promotor y las secuencias iniciadoras. Cualquier secuencia de control de expresión adecuada y las combinaciones de célula huésped/vehículo de clonación se contempla como lo sabe el experto en la técnica basado en la descripción suministrada en la presente memoria.

35
40
45

Las secuencias de control de expresión y las combinaciones de célula huésped/vehículo de clonación son bien conocidos en la técnica y se describen por vía de ejemplo, en Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. En general, las técnicas de ADN recombinantes implica obtener por síntesis o aislamiento una secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante de interés, e introducirla en un sistema de expresión de célula huésped/vector apropiado en el que éste se expresa, bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Cualquiera de los procedimientos descritos para la inserción de ADN dentro de un vector de expresión se pueden utilizar para ligar un promotor y otros elementos de control reguladores en sitios específicos dentro del vector recombinante seleccionado. Las células huésped recombinadas se transforman luego, se infectan, se transducen o se transfieren con tales vectores o plásmidos mediante técnicas convencionales,

50

Una variedad de sistemas de célula huésped-vector (plásmido) se puede utilizar para expresar la proteína recombinante de interés. El sistema vector, tal como por ejemplo un sistema que incluye el promotor inducible arabinosa es compatible con la célula huésped utilizada. El ADN que codifica el producto de proteína recombinante de interés se inserta dentro de un sistema de expresión, y el promotor (el promotor inducible por arabinosa), y los otros elementos de control se ligan en sitios específicos dentro del vector de tal manera que cuando el vector se inserte dentro de una célula huésped (por transformación, transducción o transfección, dependiendo del sistema de vector de célula huésped utilizado) el ADN que codifica el producto de proteína recombinante de interés se expresa por la célula huésped.

55
60

El vector se puede seleccionar de uno de los vectores víricos o vectores no víricos descritos anteriormente, pero debe ser compatible con la célula huésped utilizada. El vector de ADN recombinante se puede introducir dentro de las células huésped apropiadas (bacterias, virus, levadura, células de mamífero o similares) o transformación, transducción, transfección, etc. (dependiendo del sistema de vector/célula huésped). Los sistemas de huésped-vector incluyen, pero no se limitan a, bacterias transformadas con ADN bacteriófago, ADN de plásmido o ADN cósmido.

65

La expresión en células procariotas del producto de proteína recombinante de interés se puede llevar a cabo en cualquier especie adecuada de cepa o bacteria, tal como *E. coli*, con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o proteínas de no fusión.

Los vectores de fusión agregan un número de aminoácidos a una proteína codificada allí, al terminal amino o carboxi de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente a tres propósitos: 1) incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, se introduce en vectores de expresión de fusión, un sitio de división proteolítico en la articulación del grupo funcional de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del grupo funcional de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento de cognato, incluyen el Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores de expresión de fusión típica incluyen μ gex (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988), Pmal (New England Biolabs, Beverly; Mass.) y Prit5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan la glutatona S-transferasa (GST), proteína de unión E maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetivo.

Ejemplos de vectores de expresión *E. coli* de no fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann *et al.* (1988) *Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli*, *Gene*, 69, 301-315), y Pet lid (Studier *et al.* (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods in Enzymology*, 185, 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de polimerasa de ARN huésped de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión del gen objetivo del vector lid Pet se basa en la transcripción de un promotor de fusión 0-lag gn1 T7 mediado por un gen gnl J7 de polimerasa de ARN vírico o expresado. Esta polimerasa vírica se suministra por las cepas anfitrionas BL21 (DE3) o HMS I 74(DE3) de un prófago residente que cosecha un gen gnl T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

La secuencia reguladora de la construcción de vector es un promotor inducible de acuerdo con una realización. El uso de un promotor inducible permitirá niveles basales bajos de proteína activada a ser producidos por la célula durante el cultivo de rutina y expresión agregada. Posteriormente, las células pueden luego ser inducidas para expresar grandes cantidades de la proteína deseada durante la producción o detección. El promotor inducible se puede aislar de genomas víricos o celulares.

Los promotores inducibles que se regulan por compuestos suministrados exógenamente incluyen, sin limitación, el promotor arabinoso, el promotor metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7 (WO 98/10088); el promotor de insecto ecdisona (No *et al.*, 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351), el sistema reprimible de tetraciclina (Gossen *et al.*, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551), el sistema inducible de tetraciclina (Gossen *et al.*, 1995 Science, 268:1766-1769, ver también Harvey *et al.*, 1998 Curr. Opin. Chem Biol, 2:512-518), el sistema inducible RU486 (Wang *et al.*, 1997 Nat. Biotech., 15:239-243 and Wang *et al.*, 1997 Gene Ther., 4:432-441) y el sistema inducible de rapamicina (Magari *et al.*, 1997 J. Clin. Invest., 100: 2865-2872). De acuerdo con la invención, el promotor es un promotor inducible de arabinosa.

Cualquier célula huésped bacteriana adecuada se contempla para uso en la presente invención como se entenderá por la persona experta basado en la descripción suministrada en la presente memoria. Por ejemplo, bacterias adecuadas para este propósito incluyen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serraba*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus*, o una combinación de éstas sin limitación. Cualquier cepa adecuada de cualquiera de tales bacterias adecuadas también se contempla por la presente invención. Adicionalmente, el uso de células mutadas como se reconocerá por el experto en la técnica, también se contempla por la presente invención. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar fácilmente una célula huésped apropiada para uso bajo circunstancias específicas con base en la guía suministrada en la presente memoria.

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles adecuados incluyen, sin limitación pTrc (Amann *et al.*, 1988 *Gene*, 69:301-315), los vectores de expresión arabinosa (por ejemplo, Pbad18, Guzman *et al.*, 1995 *J. Bacteriol.*, 177:4121-4130), y pETIId (Studier *et al.*, 1990 *Methods in Enzymology*, 185:60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de polimerasa de ARN huésped de un promotor trp-lac híbrido. La expresión de gen objetivo del vector pETIId se basa en la transcripción de un promotor de fusión gn10-lac T7 mediado por una gn1 T7 de polimerasa vírico coexpresado. Esta polimerasa vírica se suministra por las cepas anfitrionas BL21 (DE3) o HMS I 74(DE3) de un prófago residente que cosecha un gen gn 1 T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV5. El sistema P_{BAD} se basa en el promotor arabinosa inducible que se regula por el gen araC. El promotor se induce de arabinosa.

Otras realizaciones de la presente invención utilizan vectores de expresión regulados por arabinosa, o vectores en el que la expresión de la proteína recombinante de interés está bajo el control de un promotor arabinosa, por ejemplo, el promotor para el operón arabinosa *E. coli*, P_{BAD} o P_{ARA}, sin limitación.

La secuencia de ácidos nucleicos (nucleótido) que codifica cualquier proteína deseada se contempla por la presente invención. La secuencia de nucleótido puede ser una secuencia de nucleótido de ocurrencia completa o parcialmente natural o una secuencia de nucleótido parcialmente alterada, o cualquier secuencia que híbrida a éstas bajo condiciones rigurosas. Las referencias en la presente memoria a las secuencias de ácido nucleico

corresponden a un gen se refieren a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que se puede expresar como la proteína deseada.

5 Por ejemplo, tales secuencias de ácido nucleico alteradas incluyen una eliminación de nucleótido, sustitución, que incluye transición y transversión o inserción, en el que dichas alteraciones pueden ocurrir en las posiciones determinadas 5' o 3' de la secuencia de nucleótido de referencia o en cualquier parte en el que aquellas posiciones terminales, entremezclados individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótido se determina al multiplicar el número total de nucleótidos y cualquier secuencia de porcentaje numérico del respectivo porcentaje de identidad (dividido por 100) y restar ese producto de dicho número total de nucleótidos en dicha secuencia.

15 Por ejemplo, la presente invención contempla el uso de una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos 70% de identidad con una cierta secuencia de ácidos nucleicos; una fuente variada degenerada de ésta o un fragmento de ésta, en el que la secuencia puede incluir hasta n_n alteraciones de ácido nucleico sobre la región de polinucleótido completa de la secuencia de ácidos nucleicos, en el que n_n es el número máximo de alteraciones y se calcula por la fórmula:

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

20 en la que x_n es el número total de ácidos nucleicos de cualquier secuencia y y tiene un valor de 0,70, en el que cualquier producto no entero de x_n y y se redondea hacia abajo al entero más cercano antes de restar tal producto de x_n . Por supuesto, y también puede tener un valor de 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,94 para el 94%, 0,95 para el 95%, 0,96 para el 96%, 0,97 para el 97%, 0,98 para el 98%, o 0,99 para el 99%, etc. Las alteraciones de una secuencia pueden crear mutaciones interruptoras, mutación de aminoácido o mutación por desplazamiento de marco de lectura en esta secuencia de codificación y por lo tanto alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido luego de tales alteraciones.

30 La presente invención contempla el uso de variantes degeneradas, o un fragmento de éstas. Como se define en la presente memoria, una "variante degenerada" es un polinucleótido que difiere de la secuencia de nucleótido (y fragmentos de ésta) debido a la degeneración del código genético, pero codifica a una misma proteína.

35 La secuencia de ácidos nucleicos puede comprender ADN, ADN cromosómico ADNc y ARN y puede comprender adicionalmente nucleótidos heterólogos. De acuerdo con varias realizaciones, el ácido nucleico hibrida a un cierto ácido nucleico, un complemento de éste, una variante degenerada de éste, o un fragmento de éste, bajo altas condiciones de hibridación rigurosas. En aún otras realizaciones, el polinucleótido hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas intermedias.

40 Se apreciará que en los ácidos nucleicos se pueden obtener de fuentes naturales, sintéticas, o semisintéticas; adicionalmente, las secuencias de nucleótido pueden ser secuencias de ocurrencia natural, o se pueden relacionar por mutación, que incluye sustituciones de base sencillas o múltiples, eliminaciones, inserciones e inversiones, para tal una secuencia de ocurrencia natural. La molécula de ácido nucleico puede ser ARN, ADN, monocatenario o bicatenario, de forma lineal o circular cerrada covalentemente.

45 Ejemplos de condiciones de rigurosidad se muestran en la Tabla de Condiciones de Rigurosidad a continuación: las condiciones altamente rigurosas son aquellas que son por lo menos tan rigurosas como, por ejemplo, condiciones A-F; condiciones rigurosas son por lo menos tan rigurosas como, por ejemplo, condiciones G-L; y condiciones de rigurosidad reducida son por lo menos tan reducidas, por ejemplo, condiciones M-R.

CONDICIONES DE RIGUROSIDAD

Condición de rigurosidad	Polinucleótido híbrido	Longitud híbrida (bp) ^l	Temperatura de Hibridación y Tampón ^H	Temperatura de Lavado y Tampón ^H
9	ADN:ADN	> 50	65EC; 1xSSC -or-42EC; 1xSSC, 50% formamida	65EC; 0,3xSSC
55	B	< 50	TB; 1xSSC	TB; 1xSSC
	C	> 50	67EC; 1xSSC -or-45EC; 1xSSC, 50% formamida	67EC; 0,3xSSC
	D	< 50	TD; 1xSSC	TD; 1xSSC
60	E	> 50	70EC; 1xSSC -or-50EC; 1xSSC, 50% formamida	70EC; 0,3xSSC
	F	< 50	TF; 1xSSC	Tf; 1xSSC
65	G	> 50	65EC; 4xSSC -or-42EC; 4xSSC, 50% formamida	65EC; 1xSSC

	H	ADN:ADN	< 50	TH; 4xSSC	TH; 4xSSC
	I	ADN:ARN	> 50	67EC; 4xSSC -or-45EC; 4xSSC, 50% formamida	67EC; 1xSSC
5	J	ADN:ARN	< 50	TJ; 4xSSC	TJ; 4xSSC
	K	ARN:ARN	> 50	70EC; 4xSSC -or-50EC; 4xSSC, 50% formamida	67EC; 1xSSC
	L	ARN:ARN	< 50	TL; 2xSSC	TL; 2xSSC
10	M	ADN:ADN	> 50	50EC; 4xSSC -or-40EC; 6xSSC, 50% formamida	50EC; 2xSSC
	N	ADN:ADN	< 50	TN; 6xSSC	TN; 6xSSC
	O	ADN:ARN	> 50	55EC; 4xSSC -or-42EC; 6xSSC, 50% formamida	55EC; 2xSSC
15	P	ADN:ARN	< 50	TP; 6xSSC	TP; 6xSSC
	Q	ARN:ARN	> 50	60EC; 4xSSC -or-45EC; 6xSSC, 50% formamida	60EC; 2xSSC
20	R	ARN:ARN	< 50	TR; 4xSSC	TR; 4xSSC
25	<p>bp^l: La longitud híbrida es aquella anticipada por las regiones hibridadas de los polinucleótidos hibridantes. Cuando se híbrida un polinucleótido con un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida, la longitud híbrida se asume que es aquella de polinucleótido hibridante. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridan, la longitud híbrida se puede determinar al alinear las secuencias de los polinucleótidos e identificar la región o regiones de complementariedades de secuencia óptimas.</p> <p>tampón^h: SSPE (1xSSPE is 0,15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, y 1,25mM EDTA, pH 7,4) se pueden sustituir para SSC (1xSSC es 0,15M NaCl y 15mM de citrato de sodio) en la hibridación y tampones de lavado; se desarrollan lavados durante 15 minutos después de que se completa la hibridación.</p> <p>T_B a T_R: La temperatura de hibridación para híbridos anticipados por ser menores de 50 pares bases de longitud debe ser 5-10EC menor que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, en el que T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares base de longitud T_m (EC) = 2 (# de A + T bases) + 4 (# de G + C bases). Para híbridos entre 18 y 49 pares base de longitud, T_m (EC) = 81,5 + 16,6 (log₁₀[Na⁺]) + 0,41 (%G + C) - (600/N), en el que N es el número de bases en el híbrido y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridación ([Na⁺] para 1xSSC = 0,165 M).</p>				

35 Ejemplos adicionales de condiciones de rigor para hibridación de polinucleótidos se proporcionan en Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, incorporado por referencia en la presente memoria.

40 La invención contempla el uso de polinucleótidos que son completamente complementarios con aquellos polinucleótidos, así como también secuencias anticodificantes. Las secuencias anticodificantes, también referidas como oligonucleótidos anticodificantes, incluyen secuencias administradas externamente y generadas internamente que bloquean la expresión de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las secuencias anticodificantes de la invención comprenden, por ejemplo, aproximadamente 15-20 pares base, sin limitación. Las secuencias anticodificantes se pueden diseñar, por ejemplo, para inhibir la transcripción al evitar la unión del promotor a una secuencia no traducida en la dirección 5' o al evitar la traslación de un transcrito que codifica un polipéptido al evitar que se una el ribosoma.

50 Los polinucleótidos se pueden preparar u obtener en cualquier forma adecuada (por ejemplo, mediante síntesis química, de colecciones de ADN del organismo en sí mismo) y puede tomar varias formas tal como, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, cebadores) como lo entenderá el experto en la técnica. El término "polinucleótido" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tal como aquellos que contienen estructuras modificadas. Los polinucleótidos pueden comprender una colección de ADN, tal como una colección de ADNc.

55 Sistemas de Expresión de Proteína 2086:

60 Se proporciona un microorganismo recombinante capaz de expresar un polipéptido 2086 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. El microorganismo recombinante comprende una secuencia de control de expresión que tiene secuencias de promotor y secuencias iniciadoras, y una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido 2086, la secuencia de nucleótido se ubica en 3' a las secuencias iniciadoras y promotoras. En un aspecto adicional, se proporciona en la presente memoria una célula huésped que comprende un polinucleótido 2086 recombinante como se describe en la presente memoria y en los documentos de patente WO 03/063766 y WO 04/094596. Como tal, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante 2086, como se describe en los documentos de patente WO 03/063766 y WO 04/094596, por ejemplo, sin limitación.

Una vez las células huésped que expresan una proteína deseada o polipéptido de la invención se han construido por transformación, transfección o infectando células huésped con plásmidos que contienen el polinucleótido 2086 correspondiente, las células huésped se cultivan bajo condiciones tales que los polipéptidos se expresan de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. El polipéptido puede luego ser aislado sustancialmente libre de componentes de células huésped contaminantes por técnicas bien conocidas por aquellos expertos en el arte.

Parámetros de Umbral:

Se pueden utilizar varios parámetros para monitorear y controlar el progreso del cultivo en términos de crecimiento celular y expresión de proteínas recombinantes. Tales parámetros incluyen, pero no se limitan a, densidad óptica (OD), el oxígeno disuelto (DO), pH, consumo de nutrientes/energía (tal como fuente de carbono), acumulación de subproductos metabólicos (por ejemplo, ácido acético), tiempo de cosecha y temperatura. Se contempla cualquier parámetro o combinación adecuada de parámetros, como lo podrá entender un experto en la técnica, basado en la guía suministrada en la presente memoria.

Un parámetro umbral se establece para determinar el punto en el que el inductor se agrega continuamente al cultivo (esto es, alimento al cultivo durante el tiempo). El parámetro umbral es un parámetro predeterminado. Un parámetro apropiado, tal como densidad óptica predeterminada, se determina fácilmente por el experto en la técnica basado en la guía proporcionada en la presente memoria de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención. Se puede utilizar un parámetro de umbral o una combinación de parámetros de umbral.

El parámetro o combinación de parámetros se pueden monitorear en cualquier intervalo de tiempo adecuado en el cultivo, por ejemplo, concentraciones de glucosa y OD₆₀₀ se pueden monitorear una hora, media hora o intervalos de cuarto de hora sin limitación.

La densidad óptica se utiliza como el parámetro umbral para la iniciación de inductor continuo de alimentación de acuerdo con una realización de la presente invención. Cuando la densidad celular del cultivo alcanza un parámetro umbral predeterminado, tal como una densidad óptica de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, el inductor alimenta luego el cultivo como se describe en la presente memoria. Un intervalo más angosto se puede establecer para el parámetro umbral. Por ejemplo, la presente invención contempla que uno puede iniciar la adición continua del inductor al cultivo cuando la densidad celular del cultivo alcanza una densidad óptica de aproximadamente 70 a aproximadamente 105, aproximadamente 75 a aproximadamente 100, aproximadamente 75 a aproximadamente 95, aproximadamente 75 a aproximadamente 85, aproximadamente 76 a aproximadamente 84, aproximadamente 78 a aproximadamente 82, o aproximadamente 80, de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La presente invención también contempla el uso de parámetros de umbral para señalar la iniciación de la alimentación de la fuente de carbono.

Cualquier dispositivo o combinación de dispositivos se contempla para uso en el monitoreo de los parámetros de umbral, como lo conocerán las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, una sonda o combinación de sondas para medir un parámetro de umbral, se puede montar en el dispositivo de fermentación (el "fermentador") y cualquier forma adecuada, sin limitación.

Velocidades de Alimentación Constantes:

Las velocidades de alimentación constantes se refieren a la velocidad en la que se agrega el inductor y/o fuente de carbono al cultivo. El inductor se agrega al cultivo después de que se ha alcanzado un parámetro umbral. La fuente de carbono también se puede agregar después de que se alcanza un parámetro umbral (y de la misma forma, la adición de la fuente de carbono se puede terminar luego de alcanzar un parámetro umbral). Estos parámetros umbral incluyen, sin limitación, densidad óptica (OD), oxígeno disuelto (DO), pH, la concentración de nutriente en el medio de cultivo, la concentración total de la primera fuente de carbono agregada al medio de cultivo, o cualquier combinación de éstos.

Cualquier velocidad constante adecuada se utiliza para agregar continuamente el inductor y/o fuente de carbono al cultivo como lo entenderá un experto en la técnica basado en la guía proporcionada en la presente memoria. De acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, se determina una velocidad constante adecuada mediante DO-DO-stat, como se describe en los ejemplos adelante. Por ejemplo, una velocidad de alimentación equivalente al controlador DO-stat se puede seleccionar al agregar suficiente glucosa para llevar la concentración hasta 15 y 24 g/l cada hora, sin limitación.

Por ejemplo, y/o fuente de carbono se puede agregar al cultivo a una velocidad constante hasta una cierta cantidad de inductor y/o fuente de carbono, tal como de aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 40 g/l, tal como, 4 g/l, 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 9,5 g/l, 9,75 g/l, 10 g/l, 10,25 g/l, 10,5 g/l, 11 g/l, 12 g/l, 13 g/l, 14 g/l, 15 g/l, 16 g/l, 17 g/l, 18 g/l, 19 g/l, 20 g/l, 21 g/l, 22 g/l, 23 g/l, 24 g/l, 25 g/l, 26 g/l, 27 g/l, 28 g/l, 29 g/l, 30 g/l, 31 g/l, 32 g/l, 33 g/l, 34 g/l, 35 g/l, 36 g/l, 37 g/l, 38 g/l, 39 g/l, 40 g/l, en función del volumen total del cultivo, se ha agregado al cultivo, sin

limitación. De acuerdo con varias realizaciones la cantidad total de inductor y/o fuente de carbono que alimenta al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, 7 g/l a aproximadamente 15 g/l, 8 g/l a aproximadamente 14 g/l, 9 g/l a aproximadamente 11 g/l, o aproximadamente 10 g/l.

5 La cantidad total de inductor a ser agregada al cultivo se puede compensar por la cantidad total de fuente de carbono agregada al cultivo. Por ejemplo, cuando la fuente de carbono es glucosa y el inductor es arabinosa, la cantidad de inductor agregada se puede reducir mediante la adición de glucosa. Por ejemplo, en una realización un total de 10 g/l de un inductor (esto es, tal como arabinosa se agrega a un cultivo de 11 g/l de fuente de carbono, tal como glucosa se agrega. El rendimiento de proteína obtenida en esta forma se aproxima al rendimiento cuando una cantidad total de 20 g/l de arabinosa (esto es, 20.000 g o 20 kg total en un cultivo de 1.000 l de arabinosa) y no se utiliza glucosa. Así, esta compensación proporcionada por los procedimientos actuales es ventajosa dado el alto costo de la arabinosa con relación a la glucosa.

15 De acuerdo con varias realizaciones de la invención, la velocidad constante en la que se agrega la fuente de carbono y/o inductor al cultivo se puede establecer en el intervalo de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 24 g/l cada hora. Por ejemplo, cuando la fuente de carbono es glucosa, la velocidad constante para la adición de la glucosa puede incluir, sin limitación, 1,8 g de glucosa/l/h, 3,3 g de glucosa/l/h, 6,7 g de glucosa/l/h, 15 g de glucosa/l/h, 16,4 g de glucosa/l/h, 18 g de glucosa/l/h, 24 g de glucosa/l/h, etc. 16,4 g de glucosa/l/h, 18 g de glucosa/l/h, 24 g de glucosa/l/h, etc. De acuerdo con varias realizaciones, se agrega un inductor tal como arabinosa en velocidades constantes de aproximadamente 1,5 g/l/h a aproximadamente 16 g/l/h.

25 De acuerdo con varias realizaciones, una vez se ha alcanzado un parámetro umbral, la alimentación sobre la fuente de carbono se puede continuar, detener o interrumpir temporalmente. La alimentación de la fuente de carbono se puede interrumpir en cuyo caso la alimentación se reiniciará a una velocidad constante una vez se alcance un umbral de partida de alimentación. Así, de acuerdo con una realización, un umbral de inicio y un umbral de detección se pueden utilizar para regular la alimentación de la fuente de carbono en el cultivo. De acuerdo con otra realización, la glucosa y arabinosa alimentan a una velocidad constante basado en el parámetro umbral, sin detener o reiniciar la alimentación.

30 La cantidad total apropiada de fuente de carbono para agregar a cualquier cultivo específico se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica basada en la guía suministrada en la presente memoria. La cantidad total de la fuente de carbono agregada al cultivo puede variar de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l (en función del volumen total en litros del cultivo) de acuerdo con una realización de la presente invención. Por ejemplo, de acuerdo con una realización, se agregan 50 g/l de glucosa durante la fase de crecimiento al partir con 10 g/l en el medio, comenzar la alimentación de glucosa a velocidad constante cuando el nivel de glucosa alcanza cero, y continuar la alimentación de glucosa a velocidad constante hasta que la OD alcanza 80 en cuyo tiempo aproximadamente 40 g/l de glucosa habría sido alimentado en adición a los 10 g/l de glucosa iniciales. De acuerdo con realización, las cantidades totales de fuente de carbono se proporcionan en forma concentrada para facilidad de producción a escala. Estas cantidades se convierten fácilmente en masa total de la fuente de carbono a ser utilizada en una circunstancia particular. Por ejemplo, 10 g/l de fuente de carbono se agrega a un cultivo de 1.000 l, la cantidad total de fuente de carbono a ser agregada se determina fácilmente como $10 \text{ g/l} \times 1.000 \text{ l} = 10.000 \text{ gramos}$ (o 10 kg) de fuente de carbono total. La cantidad total de fuente de carbono agregada puede servir como un parámetro umbral de acuerdo con varias realizaciones como se describe en la presente memoria.

45 La cantidad total apropiada de inductor para agregar a cualquier cultivo específico se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica basada en la guía proporcionada en la presente memoria. La cantidad total de inductor agregada al cultivo puede variar de aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 40 g/l (en función del volumen total en litros del cultivo) de acuerdo con varias realizaciones. De acuerdo con varias realizaciones, la cantidad total de fuente de carbono agregada al cultivo es aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, 7 g/l a aproximadamente 15 g/l, 8 g/l a aproximadamente 14 g/l, 9 g/l a aproximadamente 11 g/l, o aproximadamente 10 g/l en función del volumen total del cultivo. De acuerdo con una realización, las cantidades totales de inductor se proporcionan en forma concentrada para facilidad de producción a escala. Estas cantidades se convierten fácilmente en la masa total del inductor a ser utilizada en una circunstancia particular. Por ejemplo, cuando 10 g/l de inductor se agrega a un cultivo de 1.000 l. la cantidad total de inductor a ser agregada se determina fácilmente como $10 \text{ g/l} \times 1.000 \text{ l} = 10.000 \text{ gramos}$ (o 10 kg) de inductor total.

60 El medio de cultivo fresco contendrá típicamente una cantidad inicial de una primera fuente de carbono en el momento de inoculación con una célula huésped, creando así un cultivo. La concentración inicial se puede monitorear y la concentración de la primera fuente de carbono utilizada como un parámetro umbral.

Cualquier suplemento adecuado o nutriente además de una fuente de carbono también puede alimentar el cultivo en cantidades apropiadas. El otro nutriente o complemento se pueden monitorear y establecer los umbrales apropiadamente. Los suplementos tal como nitrógeno o fuentes de fosfato inorgánicos se contemplan para uso en la presente invención. Ejemplos de compuestos no limitantes que se contemplan para uso en los procedimientos de la presente invención incluyen KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , citrato de sodio, dihidrato, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , $(\text{Na})_2\text{SO}_4$, CaCl_2 ,

FeSO₄, cloramfenicol o cualquier combinación de estos. También se contempla el uso de una fuente de carbono o fuentes de carbono adicionales.

Densidad óptica y fase de crecimiento Log:

La introducción de una célula huésped bacteriana de medio de cultivo fresco crea un cultivo que va típicamente a través de cuatro fases de crecimiento más o menos distintas: (i) fase lag, (ii) fase log (logarítmica o exponencial), (iii) fase estacionaria, y (iv) fase de declinación (muerte). La fase log en sí misma se puede dividir adicionalmente en varias fases, tal como la fase de crecimiento log temprana, fase de crecimiento log media, y fase de crecimiento log tardía. La densidad óptica se relaciona con la fase de crecimiento log. La fase de crecimiento Log y la densidad óptica también se pueden utilizar como parámetros umbral para señalar el inicio y/o detención de la alimentación constante de la fuente de carbono y/o inductor.

Por ejemplo, inducción, o adición continua del inductor puede comenzar en la fase de crecimiento log temprana, la fase de crecimiento log media, y la fase de crecimiento log tardía. La fase de crecimiento log tardía puede ocurrir en una OD de aproximadamente 70 a aproximadamente 110. En una realización de la invención, la alimentación a velocidad constante del inductor empezará en la fase de crecimiento log tardía del medio de cultivo o en una OD de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, aproximadamente 70 a aproximadamente 105, aproximadamente 75 a aproximadamente 85, o aproximadamente 80 de acuerdo con varias realizaciones.

La OD se puede medir en varias longitudes de onda que se emplean comúnmente por aquellos expertos en la técnica. Típicamente, la OD₆₀₀ se utiliza como una medida de crecimiento celular y la densidad de las células en el cultivo. A menos que se indique otra cosa, la "OD" como se utiliza en la presente memoria se refiere a la OD₆₀₀.

Oxígeno disuelto:

Otro parámetro que puede servir como un activador para el inicio y/o detención del controlador de alimentación es oxígeno disuelto (DO) (esto es, fermentación por lotes alimentada con DO). El DO se puede controlar al ajustar la agitación, flujo de aire, complemento de oxígeno, y presión en el recipiente para contener el medio de cultivo. El umbral de DO se puede establecer en el intervalo 5% a 80% DO, tal como, 20%, 40%, o 80%. Una vez se ha establecido un umbral, el controlador de alimentación para una fuente de carbono o inductor se puede encender hasta que el umbral haya cumplido esta señal que detiene la alimentación de control. El umbral de detención puede ser otro umbral DO u otro parámetro, tal como la cantidad de fuente de carbono o inductor. Por ejemplo, siempre que el DO este por encima de 30% o 40% en un medio de cultivo, el controlador de alimentación puede iniciar hasta el momento en que el DO cae al 20%, o alternativamente, hasta 0,5 g/l o 1 g/l de una fuente de carbono o inductor que se ha agregado nuevamente de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención.

pH:

Otro parámetro que puede servir como un activador para el inicio y/o detención del controlador de alimentación es el pH (esto es, fermentación de alimentación discontinua de pH- stat). El pH se puede controlar mediante la adición de ácido o base al medio de cultivo. El umbral de pH se puede establecer en el intervalo de 6,8 a 7,2, tal como 7,0. Una vez se ha cumplido el umbral, el controlador de alimentación para una fuente de carbono o inductor se puede encender hasta que se haya cumplido el umbral que señala la detención de la alimentación de control. El umbral de detención puede ser otro umbral pH u otro parámetro, tal como la cantidad de fuente de carbono o inductor. Por ejemplo, siempre que el pH se eleve a 6,97 en un medio de cultivo, el controlador de alimentación puede empezar hasta el momento en que el pH a 6,95, o alternativamente, hasta 1 g/l de una fuente de carbono o inductor que se haya agregado nuevamente de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención.

Tiempo de Cosecha:

El tiempo de cosecha representa la cantidad de tiempo que pasa después de la inducción inicial o adición de un inductor. Cualquier tiempo de cosecha adecuado se contempla por la presente invención. El tiempo de cosecha puede variar de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 7 horas, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas, etc., de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención. Utilizando la alimentación a velocidad constante, el tiempo de cosecha, y la cantidad total de inductor, los expertos en la técnica apreciarán que cada parámetro se puede ajustar para los resultados deseados. El experto en la técnica pondrá entender cuando cosechar con base en la cantidad de alimento arabinosa debido a que ellos pueden determinar fácilmente la cantidad de alimento basado en la velocidad de alimentación y el periodo de tiempo. De esta forma, las concentraciones finales de inductor de 5, 10 y 20 g/l de alimento 3 horas se puede alcanzar, por ejemplo, sin limitación.

Concentración del inductor:

Un inductor, aquí arabinosa, en una concentración de 5 g/l a 20 g/l, se contempla por la presente invención.

5 Temperatura:

El cultivo de las actuales realizaciones se puede incubar en cualquier temperatura que permita el crecimiento de las células. Varias temperaturas en las que se incuba el cultivo asociado con crecimiento abundante incluyen, sin limitación, 22 °C, 28 °C, 37 °C, o cualquier combinación de éstos.

10

Dispositivo de Fermentación:

Cualquier dispositivo de fermentación adecuado (esto es, "fermentador") se contempla para uso en la presente invención, como se conoce por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el fermentador puede contener cualquier número de rotores (tal como, rotores Rushton), sondas de medición y/o admisión. De acuerdo con una realización, el fermentador se configura para incluir tres rotores Rushton y un anillo o tubo burbujeador para introducción de aire en el fermentador. La presente invención contempla el uso de sistemas basados en computador y/o manuales. Como tal, el sistema de fermentación puede hacer interfaz con un sistema computarizado para monitorear y controlar las fermentaciones. De esta forma, el sistema se puede automatizar completamente o parcialmente, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

15

20

Composiciones de la presente invención:

Composiciones que comprende proteínas recombinantes, tal como aquellas preparadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se proporcionan en la presente memoria. Las composiciones comprenden proteínas recombinantes en alta densidad en un cultivo, tal como las proteínas recombinantes preparadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, sin pretender estar limitada a éstas.

25

La composición comprende un cultivo que tiene proteínas recombinantes en una densidad de por lo menos aproximadamente 1,5 g/l en función del volumen total del cultivo. La densidad de la proteína recombinante es por lo menos aproximadamente 1,7 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. La densidad de la proteína recombinante es por lo menos aproximadamente 2,0 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con otra realización de la presente invención. La densidad de la proteína recombinante es por lo menos aproximadamente 3,0 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con otra realización de la presente invención.

30

35

Una composición que comprende proteína 2086 recombinante se proporciona en una realización de la presente invención. La proteína 2086, como se refiere en la presente memoria, es una proteína expresada por un polinucleótido que corresponde al gen 2086 en el serogrupo B en *N. meningitidis*, que incluye cualquier fragmento, derivado o mutación de éste. Polinucleótidos y proteínas 2086 de ejemplos no limitantes se describen en los documentos de patente WO 03/063766 y WO 04/094596.

40

La composición de proteína 2086 recombinante comprende la proteína 2086 recombinante en un cultivo en el que la proteína 2086 recombinante está en una densidad de por lo menos aproximadamente 1,5 g/l en función del volumen total del cultivo. La densidad de la proteína 2086 recombinante es por lo menos aproximadamente 1,7 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. La densidad de la proteína 2086 recombinante es por lo menos aproximadamente 2,0 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con otra realización de la presente invención. La densidad de la proteína 2086 recombinante es por lo menos de aproximadamente 3,0 g/l en función del volumen total del cultivo de acuerdo con otra realización de la presente invención.

45

50

Las composiciones de la presente invención pueden comprender cualquier proteína, tal como una proteína preparada de acuerdo con un procedimiento de la presente invención. Las proteínas recombinantes se pueden ser proteínas lapidadas o no lapidadas. En una realización de la invención, la proteína recombinante es la proteína 2086 recombinante lapidada o no lapidada. La proteína 2086 recombinante puede ser una proteína de la subfamilia A o subfamilia B, o una combinación de éstas. Las composiciones de la presente invención pueden incluir una proteína o más de una proteína. Las proteínas se pueden ser proteínas relacionadas o no relacionadas. Por ejemplo, una composición de la presente invención puede incluir la proteína 2086 que corresponde a una o más cepas de la subfamilia A y/o una o más cepas de la subfamilia B.

55

60

Las composiciones que comprenden material para uso en conducir los procedimientos de la presente invención también se proporcionan en la presente memoria. Tales composiciones incluyen los componentes necesarios para el cultivo, que incluyen células recombinantes y nutrientes, de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Las varias composiciones se pueden proporcionar junto con un kit, de acuerdo con una realización de la presente invención. Por ejemplo, los componentes para formar el cultivo se pueden pre-empacar convenientemente en las

65

cantidades requeridas para facilitar el uso en instalaciones de laboratorio o industriales, sin limitación. Tal un kit también puede incluir etiquetas, indicios y directrices para facilitar el uso de cada componente y la forma de combinar los componentes de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención.

- 5 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar varias realizaciones de la invención. Se debe apreciar por aquellos expertos en el arte que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se pueden considerar que constituyen varios modos para su práctica.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Fermentación de alimentación discontinua con alimentación a velocidad constante.

- 15 Se utilizó la subfamilia B de *E. coli* (pPW62) como una cepa modelo para un procedimiento de fermentación de alimentación discontinua. Basado en los resultados, el procedimiento será aplicado a la subfamilia A de *E. coli* (pPW102).

- 20 Una solución de alimentación y medio para la fermentación de alimentación discontinua se preparó utilizando los componentes como se enumeran en las siguientes tablas.

Medio y solución de alimentación:

Tabla 1. Medio Basal

Componente	Cantidad por litro
Dextrosa, Anhidra	10g
KH ₂ PO ₄	3g
K ₂ HPO ₄	7g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Citrato de Sodio, Dihidrato	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 g
(Na) ₂ SO ₄	0,58 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,075 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,09 g
Solución madre de traza de metal a 1000x (Tabla 6)	1 ml
Cloramfenicol	15 mg

Tabla 2. Solución Madre Traza de Metal a 1000x

Componente	Cantidad por litro
ZnSO ₄ •7H ₂ O	30 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	9g
MnSO ₄ •H ₂ O	4,2 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,6 g
Ácido Molíbdico, Sal de Amonio, Tetrahidrato	1,5 g

Tabla 3: Solución de Alimentación de Glucosa Concentrada

Componente	Cantidad por litro
Glucosa	500/700 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g

65

Tabla 4: Solución de Alimentación de Arabinosa Concentrada

Componente	Cantidad por litro
Arabinosa	250/500 g y varía en base al experimento
KH ₂ PO ₄	3g
K ₂ HPO ₄	5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g

Procedimientos:

La fermentación de alimentación discontinua con velocidad de alimentación constante se utilizó para alcanzar alta densidad celular en fermentación de *E. coli*. La concentración de glucosa inicial es 10 g/l en el medio. La concentración de (NH₄)₂SO₄ se incrementó a 3 g/l en el medio de fermentación, pero se mantuvo en 1 g/l en el medio de cultivo sembrado. Para determinar la velocidad de alimentación, se realizó primero la alimentación discontinua de DO-stat. El nivel de DO se controló al 20% mediante un controlador de cascada que incrementa la velocidad de agitación al máximo y luego utiliza complementación con oxígeno. Cuando se agotó la glucosa, el DO se elevó agudamente (por encima de 40%) y el concentrado de glucosa se agregó a la concentración final de 1 g/l en el fermentador. Después de cada adición de glucosa, la bomba permanece apagada durante un tiempo establecido antes de permitir hacer la siguiente adición. La OD máxima de aproximadamente 160 se alcanzó cuando se desarrolló la fermentación de alimentación discontinua de DO-stat. La velocidad constante se seleccionó luego para ser equivalente al controlador DO-stat que agrega suficiente glucosa para llevar la concentración hasta 18 g/l o 24 g/l cada hora. Durante la fermentación de alimentación discontinua con alimentación a velocidad constante, la alimentación de glucosa se inició a la velocidad constante deseada cuando hay un incremento agudo al 40% en DO.

Se iniciaron los cultivos de semillas utilizando un frasco de *E. coli* (pPW62) por litro de medio basal + 15 µg/ml cloramfenicol en un frasco Fernbach de 2800 ml. Los frascos se incubaron a 32 °C, 150 rpm durante la noche (~16 hrs). La OD₆₀₀ final es normalmente ~3. Se utilizó un tamaño de inóculo del 10% para inocular cada fermentador. Cada fermentador utiliza 3 rotores Rushton y un burbujeador de anillo. Puntos de tiempo iniciales: temperatura: 36 °C, pH: 7,00 ± 0,05 (controlado con 7,4 N NH₄OH), flujo de aire: ~1 vvm, DO: 20%. El DO se controló mediante una cascada de agitación (mín: 150 rpm, máx: 1000 rpm) y adición de O₂ por vía de una unidad de mezcla de gas. La espuma se controló, si es necesario, mediante adición manual de PPG-2000. 0,35 ml/l AF se agregó al medio antes de esterilización. Durante la fermentación, se tomaron muestras cada hora para monitorear la glucosa, pH, y OD₆₀₀ fuera de línea. Los sobrenadantes se prepararon a partir de muestras 1 ml y se almacenaron para análisis posterior de ácidos orgánicos por HPLC.

Resultados:Fermentación de alimentación discontinua con alimentación a velocidad constante:

La Figura 1 muestra los cursos de tiempos de OD, consumo de glucosa, y acumulación de ácido acético con velocidad de alimentación constante. Las OD máximas de 158 y 150 se obtuvieron con velocidades de alimentación constantes de 24 g de glucosa/l/h y 18 g de glucosa/l/h, respectivamente. Se acumularon 28 g/l de alta glucosa durante la serie cuando se utilizó una velocidad de alimentación de 24 g/l/h. La glucosa se acumuló a 12 g/l cuando se utilizó una velocidad de alimentación de 18 g/l/h. Se produjo poco ácido acético (esto es menos de 1,5 g/l) en ambos casos. La fase de crecimiento exponencial termina cerca de OD 100. La velocidad de crecimiento específica es aproximadamente 0,60 (hr⁻¹) en ambos casos.

Para reducir la acumulación de glucosa, se examinó la baja velocidad de alimentación constante de 16,4 g/l/h y 15 g/l/h. La Figura 2 muestra los cursos de tiempos de OD, consumo de glucosa, y acumulación de ácido acético con velocidades de alimentación constante mencionadas anteriormente. Las OD máximas son 142 y 147, respectivamente. Como en series anteriores, el cultivo con velocidad de alimentación más rápida acumula más glucosa, aunque la cantidad de glucosa acumulada es mucho menor que en experimentos anteriores. Aproximadamente 8 g/l de glucosa se acumuló durante los 16,4 g/l/h, y 5,4 g/l de glucosa durante 15 g/l/h de fermentación. Se produjo poco ácido acético (tal como menos de 1,5 g/l) en ambos casos (véase la Figura 2). La velocidad de crecimiento específico es aproximadamente 0,60 (hr⁻¹) en ambos casos. De este modo, la velocidad de crecimiento específica no se vio afectada por la velocidad de alimentación entre 15 g/l/h y 24 g/l/h.

Inducción en Varias OD de Crecimiento:

Se utilizó una velocidad de alimentación constante de 15 g de glucosa/l/h para el estudio de inducción de arabinosa ya que esto resulta en alta densidad celular y baja acumulación de ácido acético y glucosa. En este experimento, las inducciones en la fase de crecimiento log media OD -55 y se comparó la OD de fase de crecimiento tardía ~80. El cultivo se indujo al sustituir simplemente la alimentación arabinosa para la alimentación de glucosa y alimentar la

arabinosa a una velocidad constante de 13,4 g/l/h. Se agregó un total de 40 g/l arabinosa a cada cultivo durante el curso de 3 horas. Después de inducción, se tomaron muestras cada hora para ensayo rLP2086 por SDS-PAGE, ensayos de arabinosa y ácido orgánico por HPLC.

- 5 La Figura 3 muestra los cursos de tiempo de OD y la producción de rLP2086 cuando se indujeron en OD de ~55 y ~80. La OD máxima y el rendimiento de rLP2086 son mayores cuando las células se indujeron en OD ~80 (OD máxima: 101 vs. 84; rendimiento máximo: 1,8 g/l vs. 1,2 g/l).

Inducción con Varios Niveles de Arabinosa:

10 El propósito de los siguientes experimentos es evaluar la cantidad total de alimento arabinosa al cultivo y examinar si la reducción de la cantidad total de alimento arabinosa al cultivo resultaría en alta expresión rLP2086. El concentrado Arabinosa alimenta 4 diferentes cultivos cada uno en diferentes velocidades de alimentación durante el curso de 3 horas, que resulta en concentraciones de arabinosa finales de 10, 20, 30, y 40 g/l. Todos los cultivos se indujeron en OD₆₀₀ ~80. La Figura 4 muestra el curso de tiempo de OD y producción de rLP2086. La Tabla 5 resume la OD y los rendimientos de rLP2086 para cada una de las cuatro condiciones. Esto muestra el rendimiento de rLP2086 máximo de: 1,2 g/l para 10 g/l total arabinosa agregada; 1,6 g/l para 20 g/l total arabinosa agregada; 1,7 g/l para 30 g/l total arabinosa agregada; 2,0 g/l para 40 g/l total arabinosa agregada. Una alimentación de arabinosa de entre 20 g/l y 40 g/l resulta en rendimiento de rLP2086, similar, sin embargo, 10 g/l de arabinosa produce mucho menos rLP2086 (esto es, 1,2 g/l). Estos resultados sugieren que la cantidad total de arabinosa agregada para inducción se puede reducir de 40 g/l a 20 g/l sin reducir la productividad de rLP2086. Así, la reducción en el uso de arabinosa será más efectiva en costos, especialmente considerando el alto costo de la arabinosa (aproximadamente \$500 dólares/kg).

25 **Tabla 5. Inducción con varios niveles de arabinosa**

Lote	Total de alimento de arabinosa (g/l)	RLP2086 máxima (g/l)
X-BRN05-027	10	1,2
X-BRN05-024	20	1,6
X-BRN05-025	30	1,7
X-BRN10-114	40	2,0

Comparación del procedimiento de adición de arabinosa:

35 Se condujo el siguiente experimento para examinar si una estrategia de alimentación continua es superior a una estrategia de adición por lotes única cuando se aplicó a arabinosa para inducción. En la serie X-BRN05-039, 20g/l de arabinosa se agregó al fermentador todo de una vez, a diferencia de alimentación durante el curso del tiempo, cuando la OD es aproximadamente 80. La Figura 5 muestra el curso de tiempo de la OD, glucosa y el consumo de arabinosa, y la producción de rLP2086. Se obtuvo un máximo de 1,3 g/l de rLP2086 la adición por lotes de la arabinosa, aunque operacionalmente más simple, produce menos rLP2086 que la alimentación continua. Así, una estrategia de alimentación de arabinosa continua es superior a la adición por lotes única.

40 Para examinar si la arabinosa puede ser más eficientemente utilizada al reducir la velocidad de alimentación de arabinosa, se comparó la velocidad de alimentación de 3,3 g arabinosa/l/h y 6,7 g arabinosa/l/h. La Figura 6 muestra el curso de tiempo de OD y producción de rLP2086. El concentrado de Arabinosa alimenta a un cultivo a una velocidad de alimentación de 6,7 g/l/h durante el curso de 3 horas, y un segundo cultivo alimenta a una velocidad de 3,3 g/l/h durante el curso de 6 horas. Para ambos cultivos, la cantidad total de arabinosa agregada es 20 g/l. Como se muestra en Figura 6, ambas condiciones producen la misma cantidad de rLP2086 Máxima (esto es, 2,2 g/l), pero hay diferencias en las cinéticas de la producción. La mayor velocidad de alimentación resulta en una mayor velocidad de producción. El RLP2086 Máximo se alcanzó en 3 horas y 6 horas después de inducción con velocidad de alimentación de 6,7 g/l/h y 3,3 g/l/h, respectivamente. La ventaja de utilizar una velocidad de alimentación mayor (esto es, 6,7 g/l/h) es que los costos de producción (por ejemplo, costo de utilidad) será menor cuando se utilizó una mayor velocidad de alimentación que cuando se utilizó una velocidad de alimentación menor.

Efecto del tiempo de inducción en rendimiento de expresión rLP2086:

60 Para determinar el tiempo de cosecha óptimo, el perfil de alimentación normal (20 g/l de alimento arabinosa durante 3 horas) se extendió a 40 g/l de alimento durante 6 horas. En series X-BRN05-028 y X-BRN05-029, las células se indujeron en OD ~55 y OD ~80, respectivamente. La Figura 7 muestra el curso de tiempo de OD y la producción de rLP2086. Aunque la alimentación arabinosa se extendieron de 3 horas a 6 horas, de manera interesante, el título de del pico se obtuvo aún alrededor de 3 horas después de inducción. El título del producto es ligeramente mayor en el cultivo que se indujo en OD mayor. El máximo rendimiento rLP2086 en inducción OD ~55 es 2,0 g/l (X-BRN05-028)

mientras que este es 2,4 g/l en la OD-80 de inducción (X-BRN05-029). Este resultado sugiere que las células se deben cosechar 3 horas después de inducción.

Comparación de la solución de alimentación con y sin sales:

Para examinar si las sales agregadas son esenciales en la glucosa y las soluciones de alimentación arabinosa, se compararon los alimentos arabinosa y glucosa planos con glucosa estándar más sales (esto es, $K_2HPO_4/KH_2PO_4 + (NH_4)_2SO_4$) y arabinosa + alimentación de sales. Para ambos cultivos, 20 g/l de arabinosa alimenta durante el curso de 3 horas. Los perfiles de producción de rLP2086 y de crecimiento son muy similares. El rendimiento rLP2086 máximo es 1,8 g/l cuando se agregaron las sales a los alimentos, y 2,0 g/l cuando los alimentos de glucosa y arabinosa se prepararon sin sales. Estos resultados sugieren que no es necesario agregar sales a las soluciones de alimento de glucosa y arabinosa.

Fermentación de alimentación discontinua con velocidad constante de alimentación para cepa de la subfamilia B:

Se iniciaron cultivos de semillas al inocular 1 l de medio basal que contiene 15 µg/ml cloramfenicol con 1 ml de semilla de trabajo descongelada. El cultivo se hizo crecer en un frasco Fembach 2,8 l y se incubó durante aproximadamente 16 horas a 32 °C y 150 rpm. La OD₆₀₀ final es ~3,0. Los cultivos de semillas de 350 ml son transferidos asepticamente en un medio basal de 3,15 l que contiene 3 g/l $(NH_4)_2SO_4$ sin cloramfenicol. La fermentación se controló en pH 7,0±0,05 por 7,4 N NH_4OH , temperatura a 36 °C, DO al 20%, y flujo de aire en 1 vvm. El DO se controló mediante una cascada de agitación (mín: 150 rpm, máx: 1000 rpm) y adición de oxígeno. La antiespuma PPG-2000 se agregó automáticamente para controlar la espuma. Durante la fermentación, se tomaron muestras cada hora para monitorear la glucosa y la OD fuera de línea. Después inoculación, el DO cae de ~100% a 20% y luego se mantuvo en 20%. Cuando hubo un aumento agudo en DO del 20% a más del 40% (usualmente 6 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT)), la bomba de alimentación de glucosa (sin sales) se encendió a una velocidad de 15 g/l/h. Como se muestra en Figura 8, la glucosa se agota completamente después de un EFT de 6, que resulta en un aumento agudo en el DO. Las muestras se tomaron cada media hora cuando la OD alcanza ~40. La alimentación de glucosa se apagó en OD 90 y la alimentación de arabinosa se encendió a una velocidad de 13,4 g/l/h. Después 3 horas de alimentación de arabinosa (sin sales) (esto es, un total de adición de arabinosa de 20g/l), la alimentación de arabinosa se apagó y a la fermentación se le permitió continuar durante otra hora. Como se muestra en la Figura 8, se obtuvo una OD de 102 y se expresaron 2,0 g/l de MnB rLP2086 con base en el SDS-PAGE (véase Figura 9). El pico ocurre 3 horas después de inducción (esto es, EFT de ~12 horas). El SDS-PAGE y Transferencia Western muestran que la proteína expresada es de hecho rLP2086 de la subfamilia B.

Aplicación del procedimiento de fermentación de alimentación discontinua para cepa de rLP2086 MnB de la subfamilia A:

Para probar si un procedimiento de fermentación de alimentación discontinua utilizado para rLP2086 de la subfamilia B se puede aplicar a rLP2086 de la subfamilia A, se condujo el procedimiento utilizando el procedimiento establecido para la cepa de la subfamilia B. la Figura 10 muestra el curso de tiempo de OD, consumo de glucosa y arabinosa, y producción de rLP2086. Los perfiles de producción de rLP2086 y de crecimiento para la subfamilia A son similares a aquellos obtenidos para la subfamilia B (compare con la Figura 8). El SDS-PAGE y Transferencia Western muestran que la proteína expresada es de hecho rLP2086 de la subfamilia A (véase Figura 11). La Tabla 6 enumera las OD máximas y los rendimientos de expresión de rLP2086 para seis diferentes series de la subfamilia A. El intervalo de rendimiento de la expresión de rLP2086 máxima es 1,5-2,1 g/l (rendimiento máximo promedio: 1,8±0,2 g/l), similar a los resultados de las fermentaciones de alimentación discontinua utilizadas para producir rLP2086 de la subfamilia B. De este modo, la fermentación de alimentación discontinua desarrollada para la cepa de la subfamilia B también es adecuada para la cepa de la subfamilia A.

Tabla 6. Rendimiento máximo de expresión de rLP2086 de la subfamilia máxima A y OD

Lote	rLP2086 Máxima (g/l)	OD Máxima
X-BRN10-118	1,9	104
X-BRN10-119	1,9	104
X-BRN10-120	1,6	100
X-BRN05-042	1,5	100
X-BRN05-043	2,0	77
X-BRN10-121	2,1	92

Alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la inducción de arabinosa:

Para reducir la cantidad de arabinosa necesitada sin reducir la producción de rLP2086, se investigó la alimentación dual de glucosa y arabinosa durante el periodo de inducción.

La estrategia es alimentar con 10 g/l de arabinosa durante 3 horas (la mitad de la cantidad usual) mientras se continúa la alimentación de glucosa durante la fase de inducción a 25% (3,75 g/l/h), 50% (7,5 g/l/h), y 100% (15 g/l/h) de la velocidad de alimentación de la glucosa estándar. Todas las alimentaciones, glucosa y arabinosa, se prepararon sin aditivos.

Las Figuras 12a, 12b, y 12c, muestran el curso de tiempo del crecimiento celular de la subfamilia B, la glucosa, arabinosa, concentraciones de ácido acético, y la producción de rLP2086. Todas las tres series se indujeron a OD ~80. Como se muestra en la Figura 12a, la OD de la serie de alimentación de glucosa al 100% continúa surgiendo después de inducción, pico a 117, mientras el pico de serie a 50% a 106 (Figura 12b) y la serie a 25% se mantuvo alrededor 100 (Figura 12c) después de inducción. La alimentación de glucosa al 100% empieza a acumular glucosa y arabinosa durante 3 horas post-inducción. La serie de glucosa a 50% solo muestra una cantidad ligera de glucosa en la última muestra (lectura = 0,21 g/l). No hay acumulación de glucosa en la serie de glucosa a 25%. Ninguna de las tres series acumula cualquier arabinosa. Las series de alimentación de glucosa a 100% (Figura 12a) y 50% (Figura 12b) producen ~1,5 y 1,7 g/l de rLP2086, respectivamente, mientras la serie a 25% (Figura 12c) produce 2,1 g/l. El pico de producción de las series a 100% antes de la serie de arabinosa, sugiere que la expresión rLP2086 se pudo haber suprimido mediante la acumulación de glucosa y ácido acético. El pico de producción de las series a 50% del tiempo aproximado de la serie de arabinosa y el pico de producción de la serie a 25% después de que la serie de arabinosa sugiere que la expresión 2086 no se suprimió tanto como la concentración de glucosa se controló a un nivel mínimo (no hay glucosa acumulada en las Figuras 12b y 12c). Aunque solo 10 g/l de arabinosa alimenta a estos cultivos, su producción de rLP2086 es similar a aquel obtenido cuando se alimentó con 20 g/l. Las alimentaciones simultáneas de glucosa y arabinosa pueden reducir el consumo de arabinosa por 50% y todavía alcanza el mismo rendimiento del rLP2086 cuando la concentración de glucosa se controló a un nivel bajo durante la inducción. Así, el costo de químicos se puede reducir significativamente.

Para examinar si uno puede adicionalmente reducir el consumo de arabinosa e incrementar el rendimiento de rLP2086, se investigaron varias velocidades de alimentación de glucosa, cantidades totales de la alimentación de arabinosa, y la inducción OD. La Tabla 7 enumera combinaciones diferentes de estas condiciones. Esto parece que la velocidad de alimentación de glucosa entre 2,25 y 7,5 g/l/h y la velocidad de alimentación de arabinosa entre 1,7 y 6,7 g/l/h no afectaría el rendimiento de rLP2086 significativamente. La inducción de las OD entre 80 y 105 resulta en rendimientos de rLP2086 similares.

Tabla 7. OD y rLP2086 máximas bajo diferente velocidad de alimentación de glucosa, cantidad diferente de adición de arabinosa e inducción a varias OD

Número de Lote	Velocidad de alimentación de glucosa (g/l/h)	Velocidad de alimentación de arabinosa (g/l/h)	Cantidad de alimentación de arabinosa	OD de Inducción	OD Máxima	RLP2086 Máxima (g/l)
X-BRN10-127	3,75	1,7	5 g/l en 3 horas	74	86	1,6
X-BRN05-056	3,75	3,3	20 g/l en 3 horas	79	122	2,8
X-BRN05-058	3,75	1,7	10 g/l en 6 horas	94	122	3,0
X-BRN10-129	3,75	6,7	20 g/l en 3 horas	110	124	2,7
X-BRN05-059	3,75	3,3	20 g/l en 6 horas	105	126	2,9
X-BRN05-061	5,25	3,3	20 g/l en 6 horas	102	112	2,6
X-BRN10-130	2,25	3,3	20 g/l en 6 horas	93	108	2,4

Ejemplo 3: Fermentación de alimentación discontinua a escala para escala de 100 l

El cultivo de semilla se inició a inocular 2 X 1 l de medio basal que contiene 15 µg/ml de cloramfenicol con 1 ml (que es, 1 frasco) de semilla descongelada para trabajo. El cultivo en 2,8 l de Fernbach se incubó durante aproximadamente 16 horas a 32 °C y 150 rpm en un agitador rotatorio.

Dos cultivos de semilla Fernbach de 1 l durante la noche se transfirieron asépticamente en un fermentador de 150 l que contiene 70 l de medio basal sin cloramfenicol. La fermentación de 150 l en medio basal se controló a pH 7,0±0,05 por 7,4 N de NH₄OH, temperatura 36 °C, DO 20%, y flujo de aire a 1 vvm. El DO se controló mediante una cascada de agitación y la adición de oxígeno. La antiespuma PPG-2000 se agregó automáticamente a la espuma de control. Durante la fermentación, la caída de DO de ~100% a 20% y se mantuvo a 20%. Cuando hay incremento agudo en DO de 20% a más de 40% (usualmente a OD ~20), la señalización del agotamiento de glucosa, la bomba

de alimentación se activó para liberar el concentrado de glucosa (que es, 500 g/l) a una proporción de 15 g de glucosa//h. Durante la fermentación, las muestras se tomaron cada hora para monitorear la glucosa y OD fuera de línea. Las muestras se tomaron cada media hora cuando la OD alcanza ~40. Una vez que la OD alcanza ~80, la alimentación de glucosa se detuvo y la alimentación de arabinosa se inició (por ejemplo, 500 g/l del concentrado de arabinosa) a una proporción de 6,7 g de arabinosa//h durante 3 horas.

La Figura 13a muestra el curso de tiempo del crecimiento celular de la subfamilia B, consumo de glucosa, consumo de ácido acético, y la producción de rLP2086 a escala de 100 l. El perfil de fermentación en la escala de 100 l es similar a aquel que se observa a una escala pequeña. Se obtuvo una OD máxima de 99 y una proporción máxima de 1,9 g/l de rLP2086. Estos resultados demuestran que la fermentación de alimentación discontinua es escalable.

La Figura 13b muestra los cursos de tiempo del crecimiento celular de la subfamilia A, el consumo de glucosa, la acumulación de ácido acético, y la producción de rLP2086 a la escala de 100 l. El perfil de fermentación a escala de 100 l es similar a aquel que se observa a una escala pequeña. Se obtuvo una OD máxima de 96 y una proporción máxima de 2,0 g/l de rLP2086. Estos resultados demuestran que la fermentación de alimentación discontinua es escalable y robusta.

La Figura 14a muestra los cursos de tiempo de la densidad celular de la subfamilia B, glucosa, arabinosa, concentraciones de ácido acético, y rendimiento de rLP2086 con la alimentación dual de glucosa y arabinosa a escala de 100 L. Durante la inducción, las velocidades de alimentación se controlaron a 3,75 y 1,67 g//h para alimentación de glucosa y arabinosa, respectivamente. El duo arabinosa y glucosa alimentan durante 5 horas. Se obtuvo una OD máxima de 90 y una proporción máxima de 1,8 g/l de rLP2086. La proporción máxima de rLP2086 aparece una inducción de 4 horas. La OD máxima promedio y la proporción máxima promedio de rLP2086 para la subfamilia B son $84,8 \pm 6,8$ y $1,6 \pm 0,3$ g/l, respectivamente. Estos resultados demuestran que la fermentación de alimentación discontinua con la alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la fase de inducción es escalable.

La Figura 14b muestra los cursos de tiempo del crecimiento celular de la subfamilia A, el consumo de glucosa, la acumulación de ácido acético, y la producción de rLP2086 a la escala de 100 l. La serie de fermentación a las mismas condiciones como en el parágrafo [0129] y las células se indujeron durante 6 horas. Se obtuvo una OD máxima de 89 y una proporción máxima de 1,8 g/l rLP2086. La proporción máxima de rLP2086 aparece a inducción de 4 horas. La OD máxima promedio es $87,9 \pm 10,5$ y la proporción máxima promedio de rLP2086 es $1,8 \pm 0,2$ g/l para la subfamilia A. Estos resultados demuestran que la fermentación de alimentación discontinua es escalable y robusta.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende:
 - 5 cultivar una célula bacteriana recombinante para expresar una proteína recombinante que comprende agregar continuamente una fuente de carbono a un cultivo que comprende la célula bacteriana recombinante y agregar continuamente un inductor al cultivo después de que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, y aislar la proteína recombinante del cultivo, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo.

2. Un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende:
 - 15 cultivar una célula bacteriana recombinante para expresar una proteína recombinante agregando continuamente una fuente de carbono a un cultivo que comprende la célula bacteriana recombinante y agregando continuamente un inductor a un cultivo que comprende la célula bacteriana después de que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, en el que la célula bacteriana comprende una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a un gen del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo.

3. Un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende:
 - 25 a) introducir en una célula huésped bacteriana un vector de expresión que codifica una proteína recombinante bajo el control de un promotor inducible para formar una célula bacteriana recombinante;
 - 30 b) introducir la célula bacteriana recombinante en un medio de cultivo para formar un cultivo celular;
 - c) agregar una fuente de carbono al cultivo celular como una alimentación continua;
 - d) monitorizar el crecimiento celular en el cultivo celular para lograr una densidad óptica umbral (OD₆₀₀);
 - 35 e) agregar un inductor del promotor inducible al cultivo celular como una alimentación continua una vez que la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ de aproximadamente 70 a aproximadamente 110, en el que el inductor es arabinosa y en el que la cantidad total del inductor agregado al cultivo es de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, en el que el procedimiento comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo mientras el inductor se agrega continuamente al cultivo; y
 - f) aislar la proteína recombinante del cultivo celular.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende agregar continuamente el inductor al cultivo cuando la densidad celular del cultivo alcanza una OD₆₀₀ seleccionada entre las siguientes: de aproximadamente 70 a aproximadamente 105; de aproximadamente 75 a aproximadamente 85; y aproximadamente 80.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende agregar continuamente el inductor al cultivo durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas después del inicio o aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas después del inicio.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cantidad total del inductor añadido al cultivo es una cantidad seleccionada entre una de las siguientes: de aproximadamente 7 g/l a aproximadamente 15 g/l; y aproximadamente 10 g/l.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende aislar la proteína recombinante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas después de comenzar a agregar el inductor al cultivo.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, que comprende aislar la proteína recombinante de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas después de comenzar a agregar el inductor al cultivo.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende agregar el inductor al cultivo a una velocidad constante.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la velocidad constante a la que se agrega el inductor al cultivo está en el intervalo de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 24 g/l cada hora.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo a una velocidad constante.
 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la velocidad constante a la que se agrega la fuente de carbono al cultivo está en el intervalo de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 24 g/l cada hora.
 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cantidad total de fuente de carbono añadida al cultivo es una cantidad seleccionada entre una de las siguientes: de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l, de 7 g/l a aproximadamente 15 g/l, de 8 g/l a aproximadamente 14 g/l, de 9 g/l a aproximadamente 11 g/l, o de aproximadamente 10 g/l en función del volumen total del cultivo.
 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende agregar continuamente la fuente de carbono al cultivo durante uno de los siguientes intervalos: antes y durante la inducción.
 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la expresión de dicha proteína recombinante está bajo el control transcripcional de un promotor inducible, por lo que la expresión génica bajo el control del promotor inducible puede regularse directamente mediante la concentración del inductor presente en el medio de cultivo.
 16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicha proteína recombinante está bajo el control de un promotor inducible de arabinosa.
 17. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicha proteína recombinante está bajo el control del promotor ParaB.
 18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicha célula huésped bacteriana es una bacteria de *Escherichia*.
 19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la fuente de carbono es glucosa.
 20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la proteína recombinante comprende una proteína lipídada o no lipídada.
 21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que la proteína comprende una proteína de la subfamilia A meningocócica 2086 o una proteína de la subfamilia B meningocócica 2086, o una combinación de las mismas.

Fermentación de alimentación discontinua en varias velocidades de alimentación constantes sin inducción

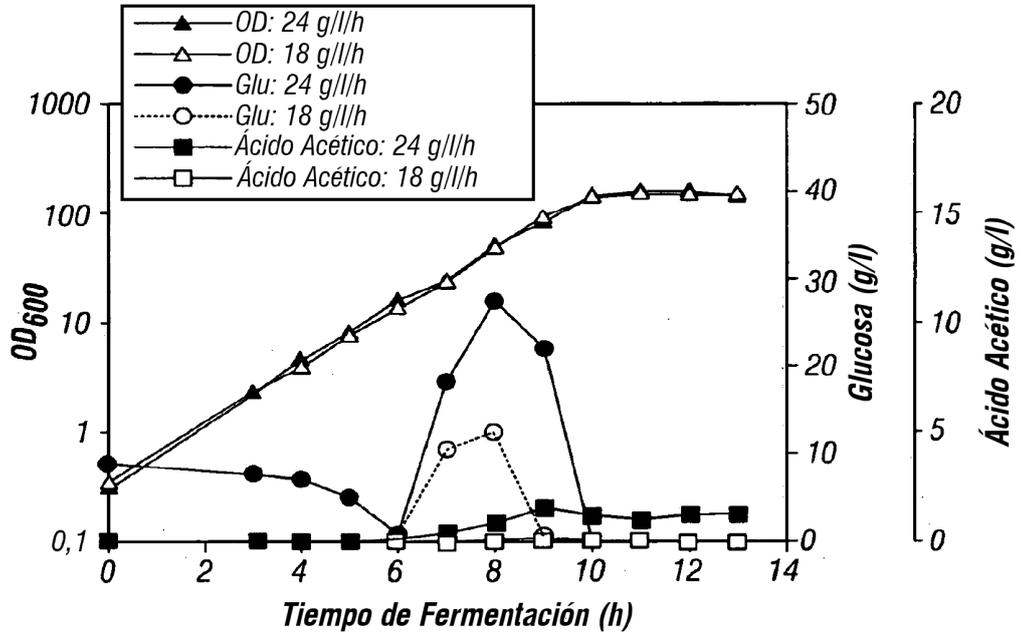


FIG. 1

Fermentación de alimentación discontinua en varias velocidades de alimentación constantes sin inducción

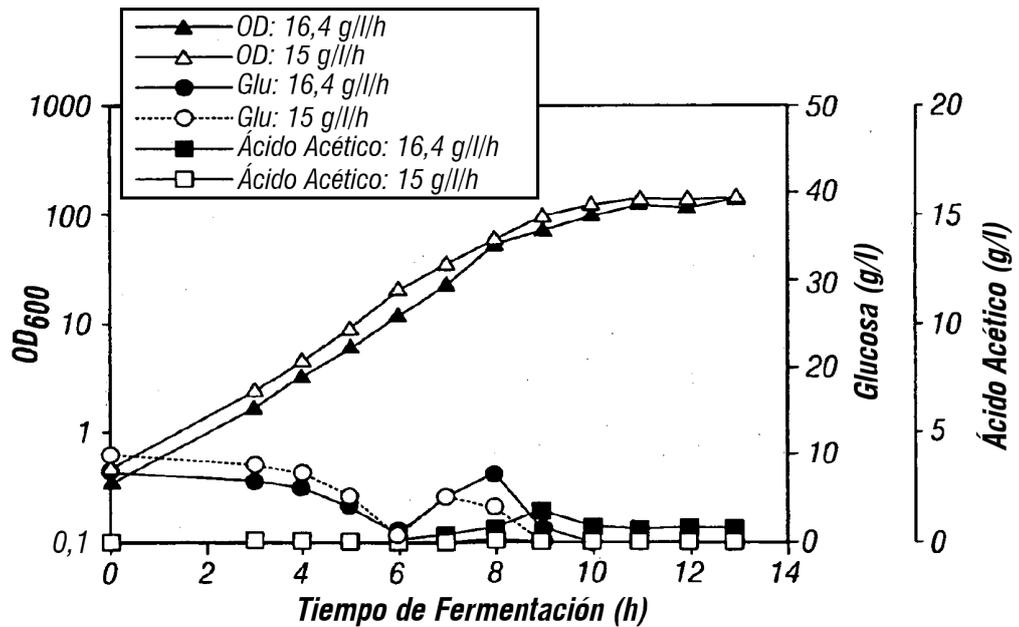


FIG. 2

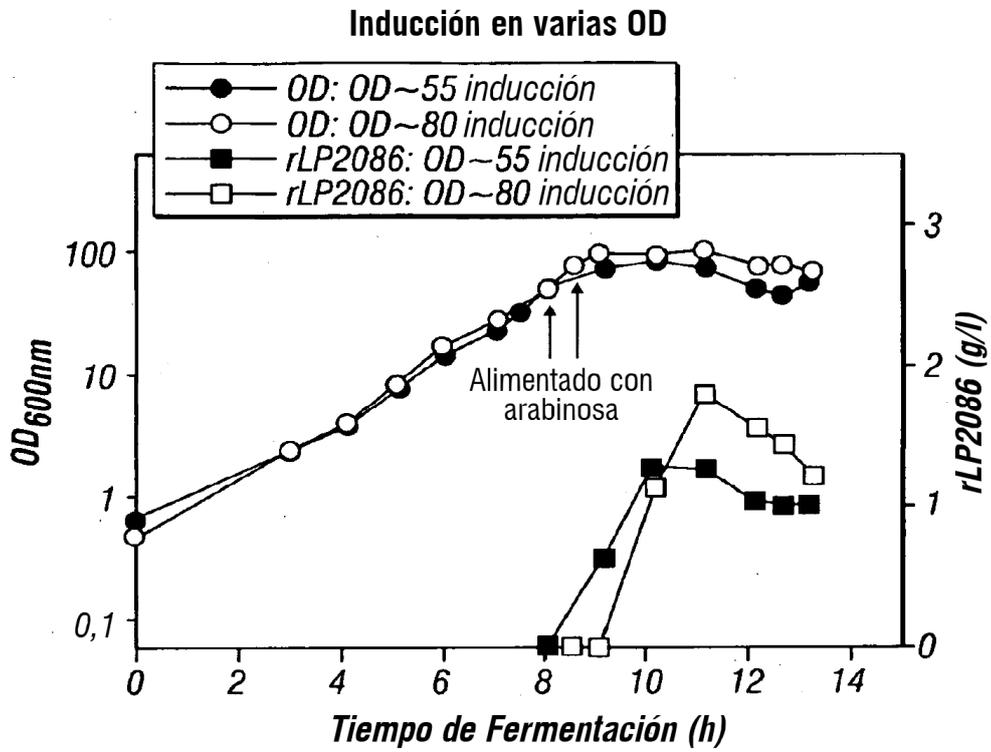


FIG. 3

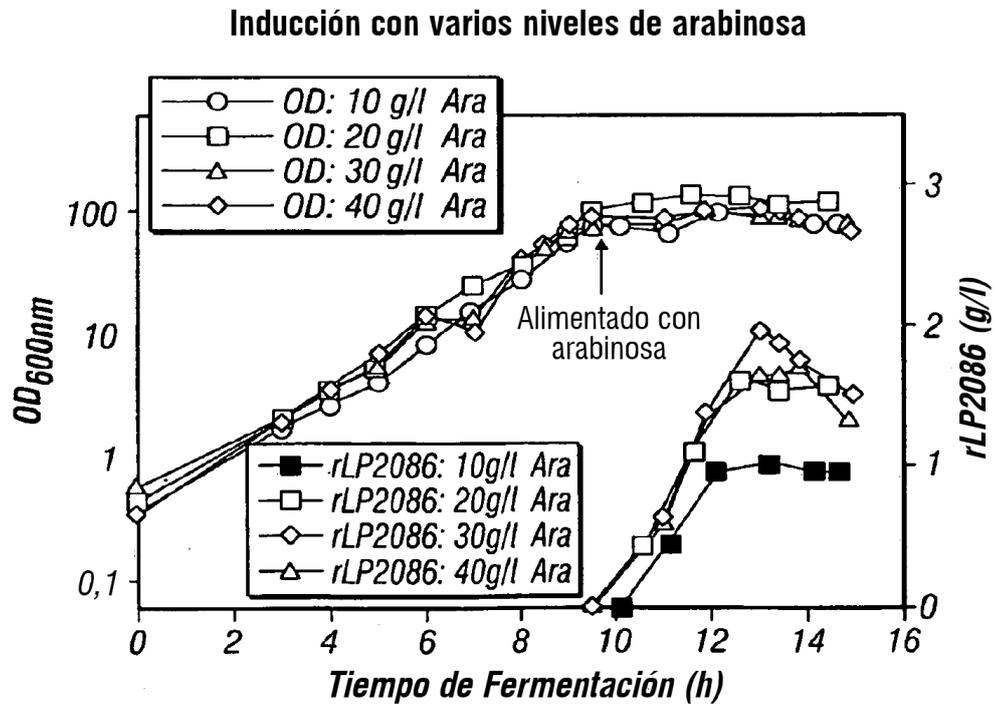


FIG. 4

Efecto del procedimiento de adición de arabinosa sobre el rendimiento de rLP2086

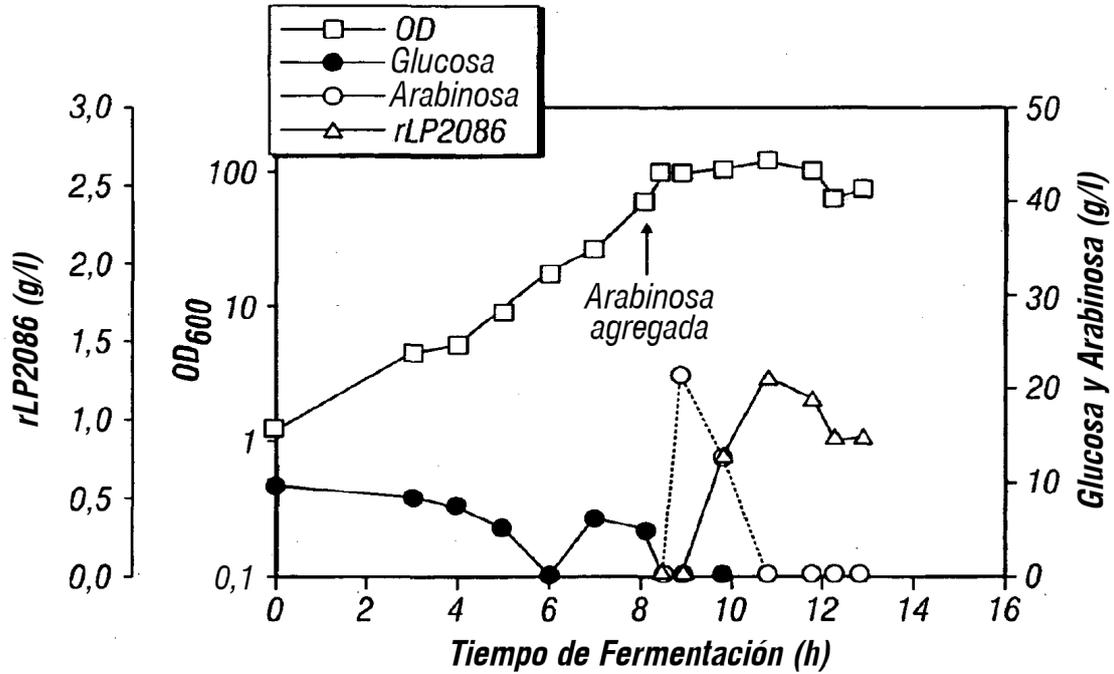


FIG. 5

Efecto de la velocidad de alimentación de arabinosa sobre la producción de rLP2086

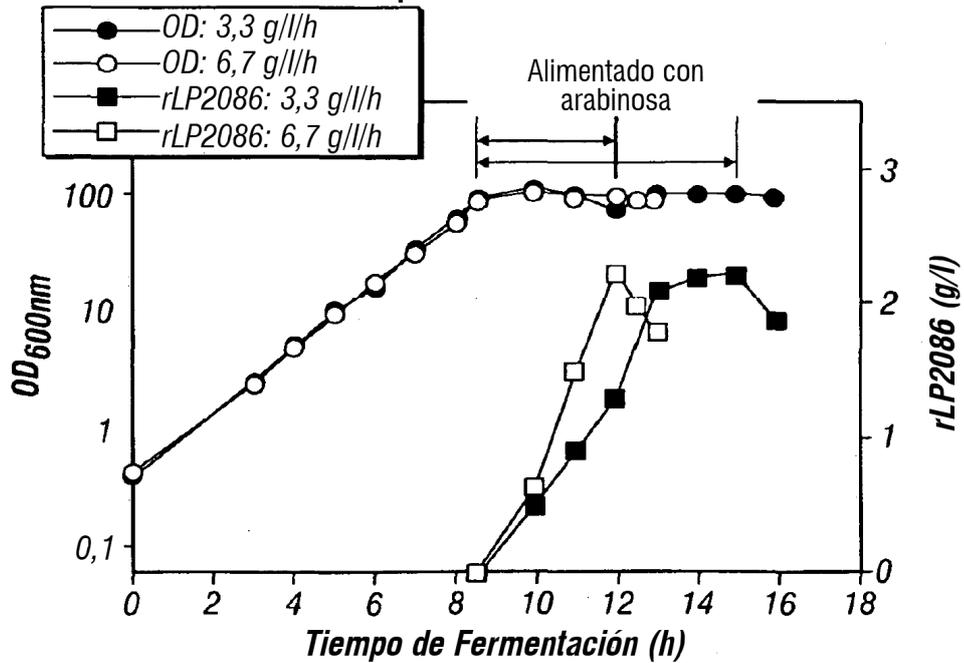


FIG. 6

Efecto del tiempo de inducción sobre la expresión

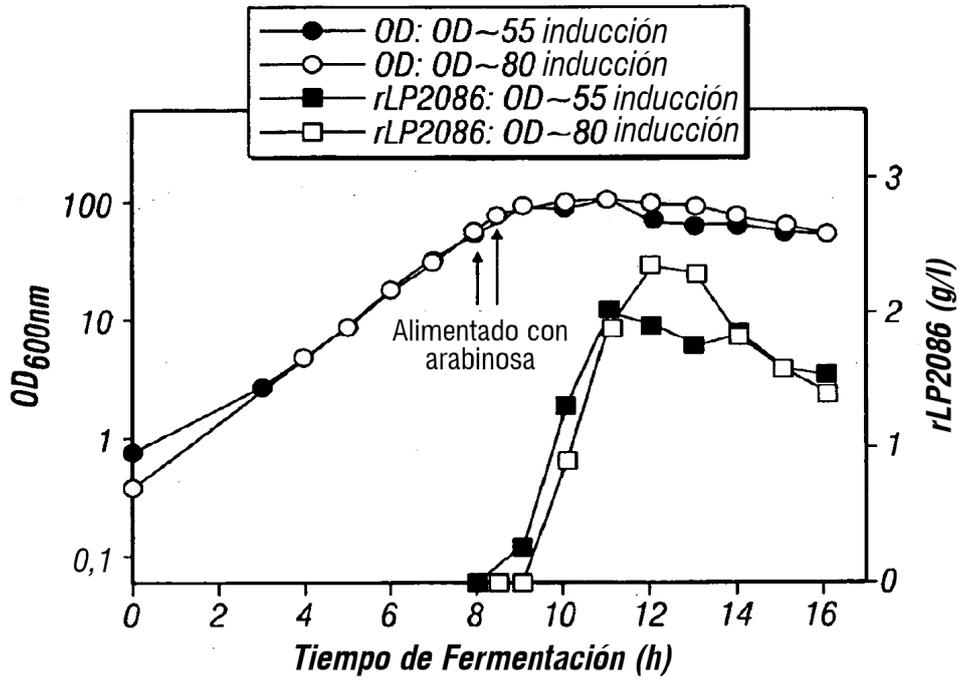


FIG. 7

Fermentación de alimentación discontinua optimizada para la producción de rLP2086 de la subfamilia B

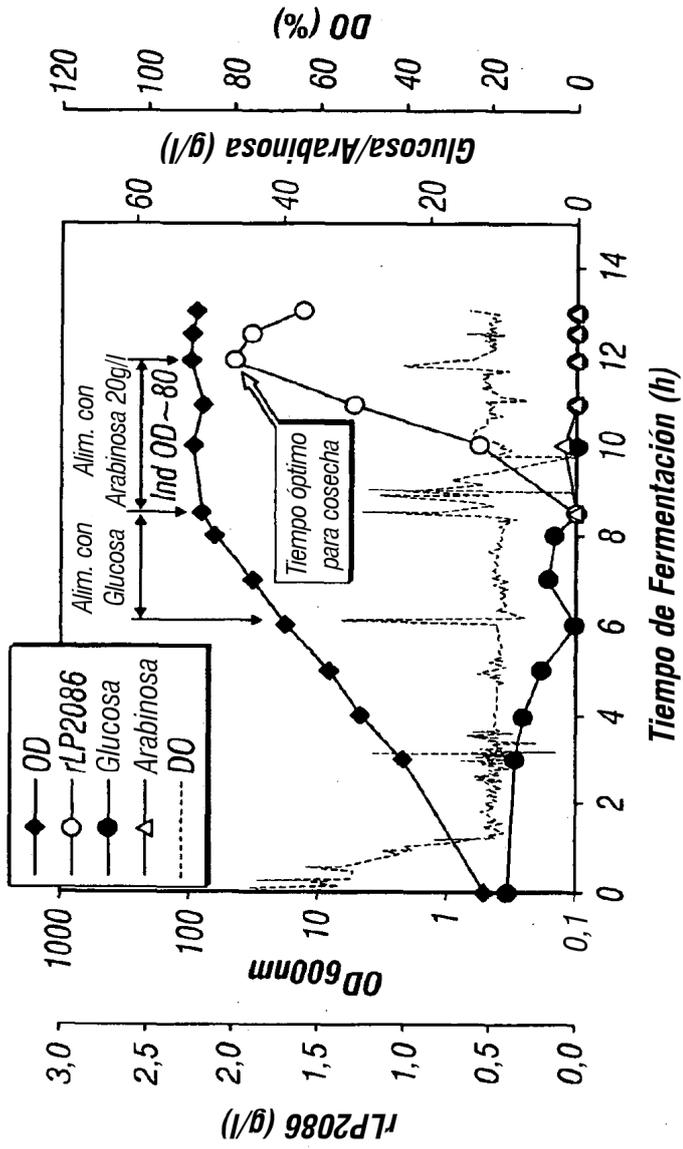


FIG. 8

SDS-PAGE y Transferencia Western de inducción de rLP2086 de la subfamilia B

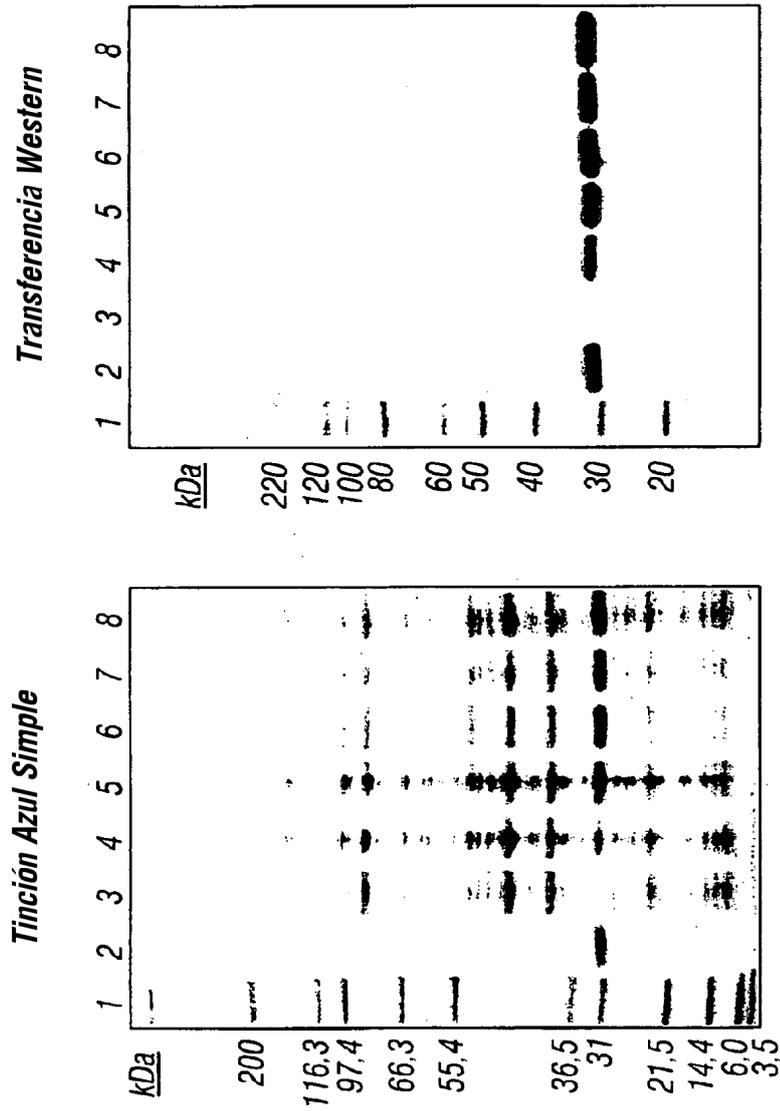


FIG. 9A

FIG. 9B

Línea 1. MWT Estándar; Línea 2. rLP2086; Línea 3. Preinducción; Línea 4. Inducción 1,1 h;
 Línea 5. Inducción 2,0 h; Línea 6. Inducción 3,0 h; Línea 7. Inducción 3,6 h; Línea 8. Inducción 4,0 h

Fermentación de alimentación discontinua optimizada para la producción de rLP2086 de la subfamilia A

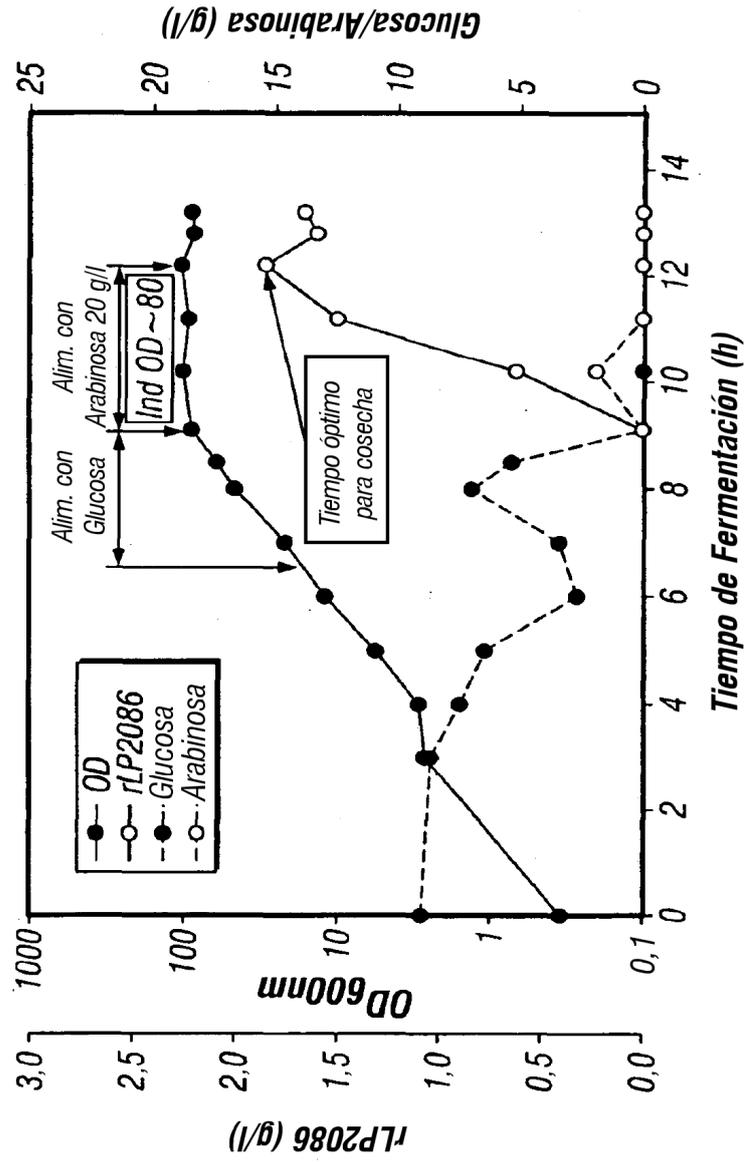


FIG. 10

SDS-PAGE y Transferencia Western de inducción de rLP2086 de la subfamilia A

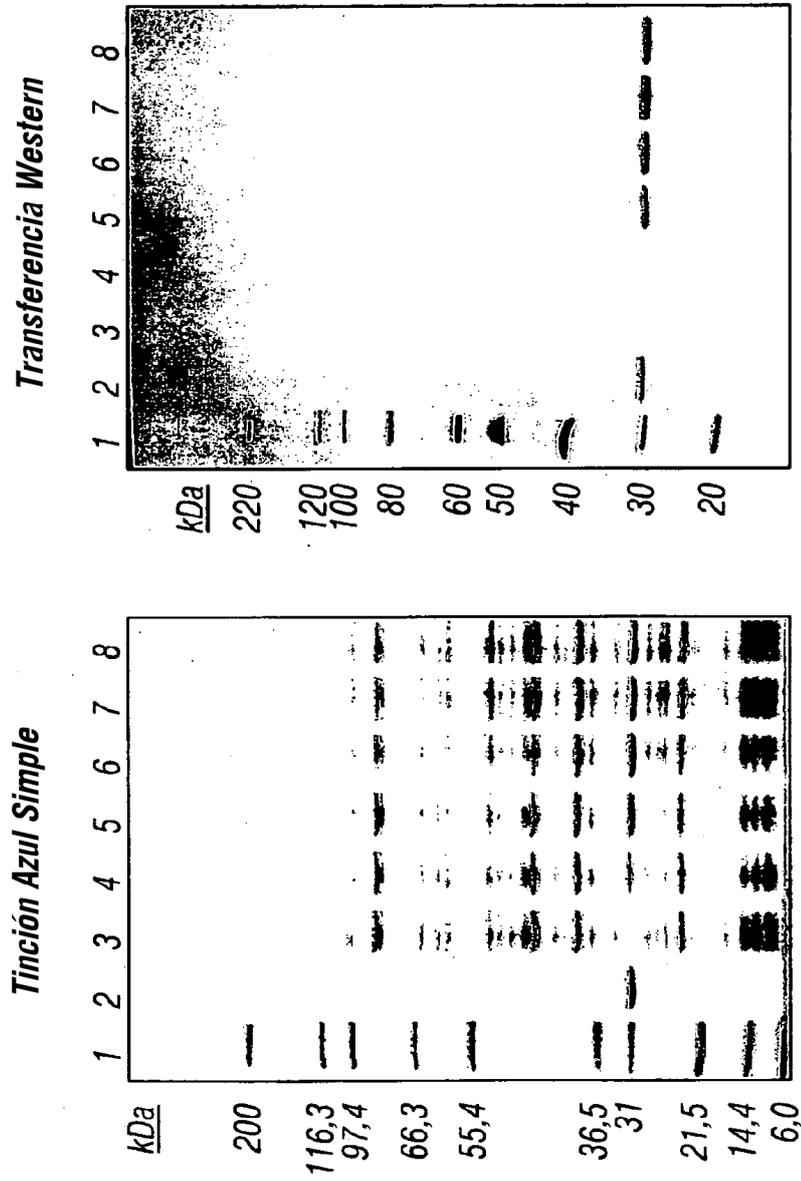
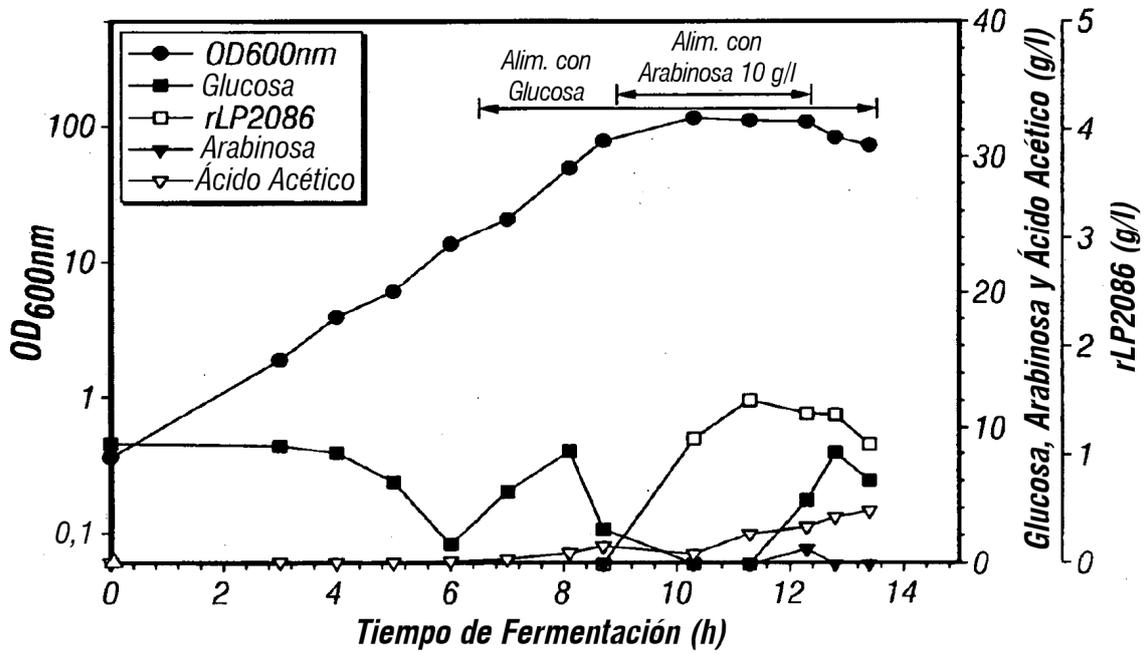


FIG. 11A

FIG. 11B

Línea 1. MWT Estándar; Línea 2. rLP2086; Línea 3. Preinducción; Línea 4. Inducción 1,1 h;
 Línea 5. Inducción 2,0 h; Línea 6. Inducción 3,0 h; Línea 7. Inducción 3,6 h; Línea 8. Inducción 4,0 h

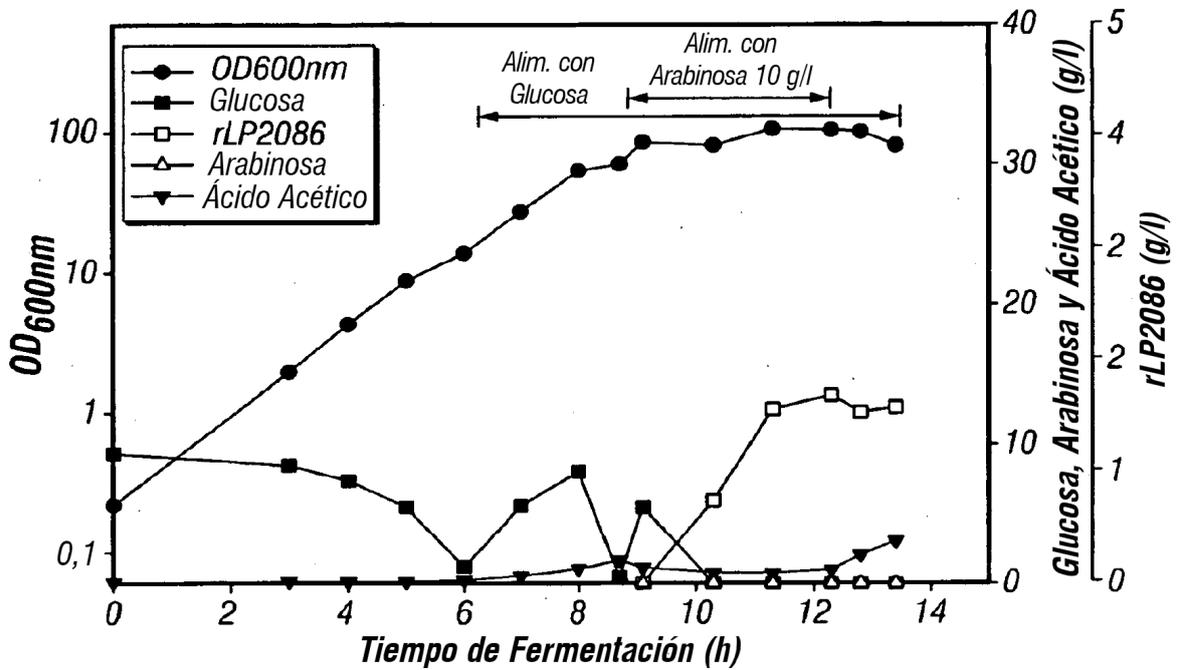
Alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la inducción



Alimentación dual: Alimentación de Glucosa 15 g/l/h;
Alimentación de Arabinosa 3,3 g/l/h

FIG. 12A

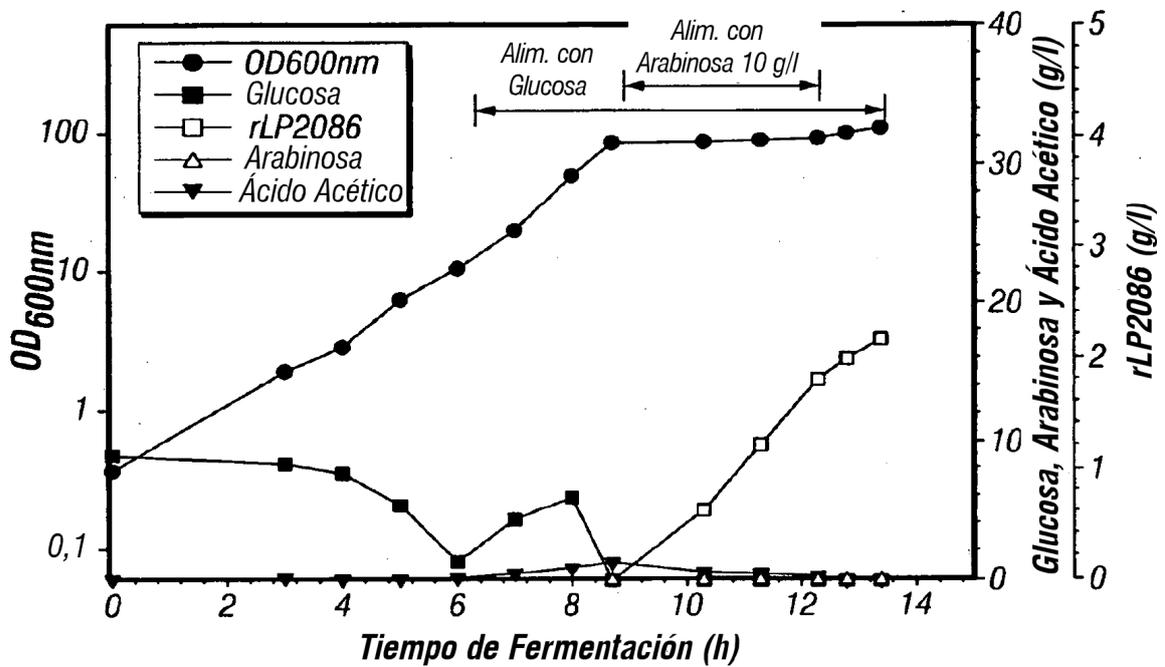
Alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la inducción



Alimentación dual: Alimentación de Glucosa 15 g/l/h;
Alimentación de Arabinosa 3,3 g/l/h

FIG. 12B

Alimentación dual de glucosa y arabinosa durante la inducción



Alimentación dual: Alimentación de Glucosa 3,75 g/l/h;
Alimentación de Arabinosa 3,3 g/l/h

FIG. 12C

Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia B de *E. coli* (pPW62) a escala de 100 l

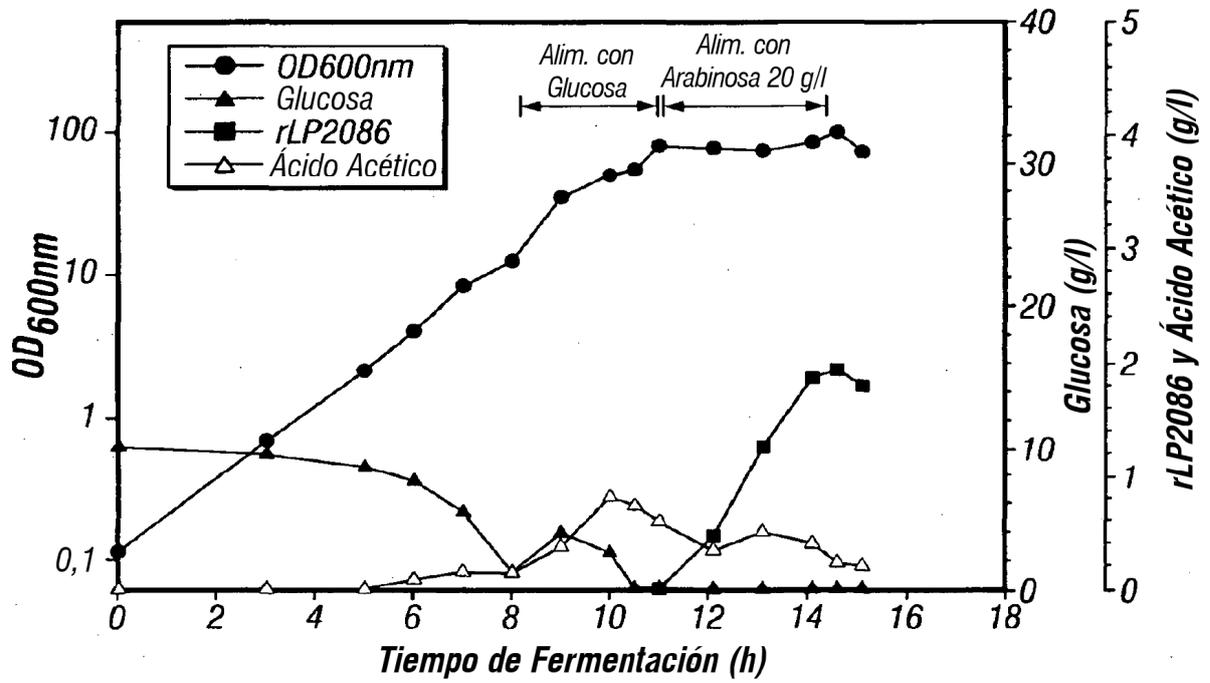


FIG. 13A

Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia A de *E. coli* (pPW102) a escala de 100 l

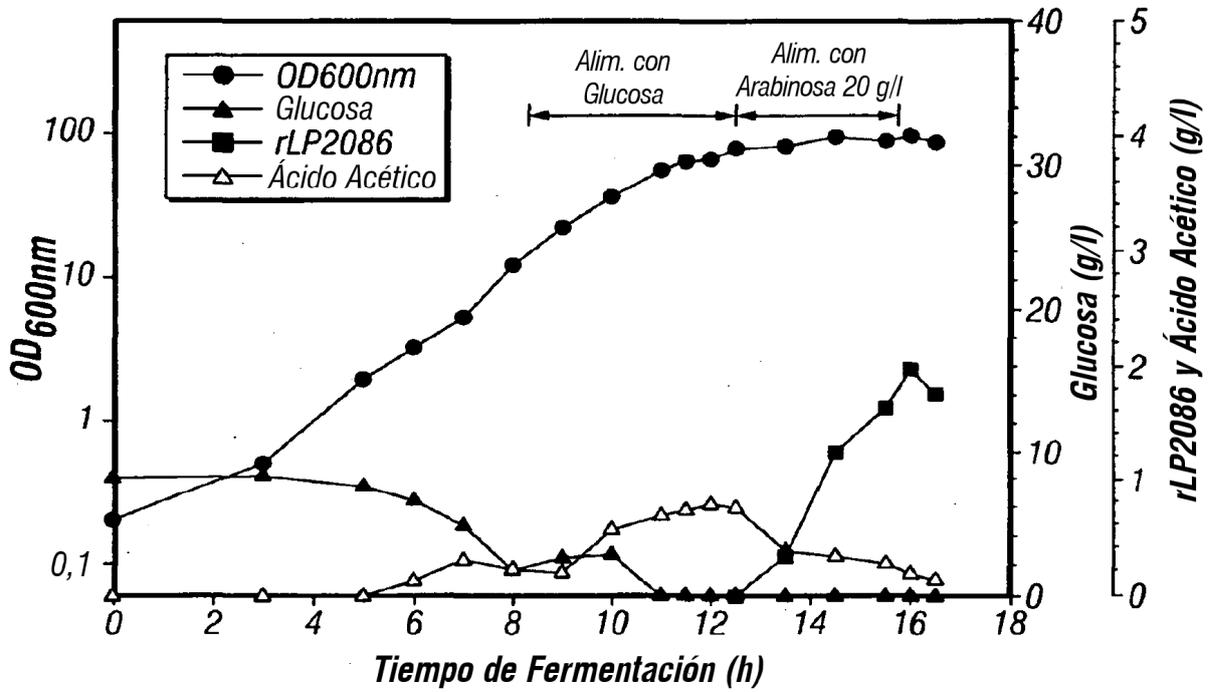


FIG. 13B

Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia B de *E. coli* (pPW62) con alimentación dual de glucosa y arabinosa a escala 100 l

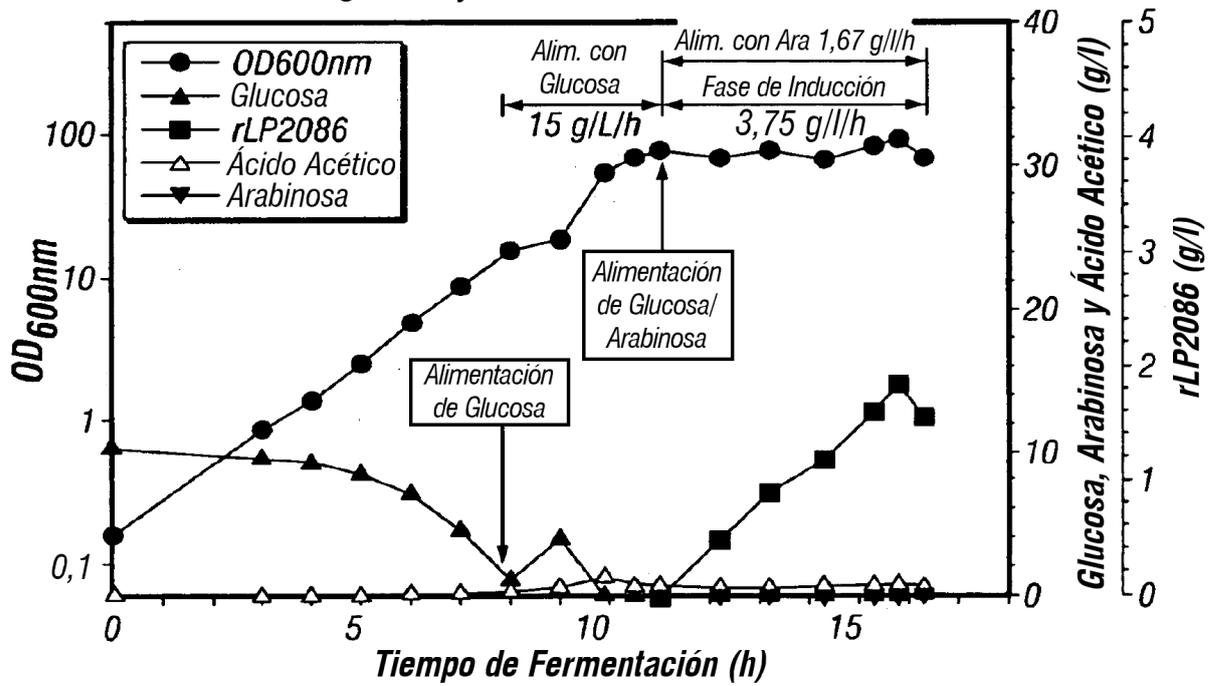


FIG. 14A

Fermentación de alimentación discontinua de rLP2086 de la subfamilia A de *E. coli* (pPW102) con alimentación dual de glucosa y arabinosa a escala 100 l

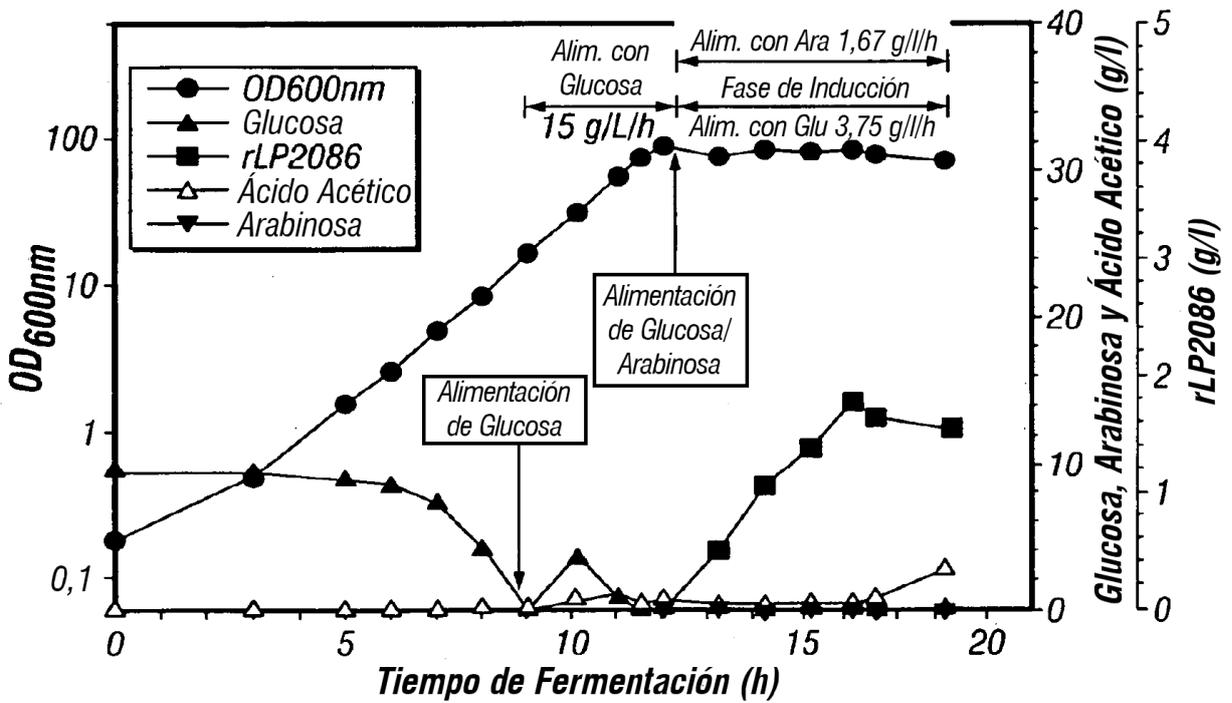


FIG. 14B