

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 985**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016** **PCT/EP2016/059597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16174195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016** **E 16722817 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3289088**

54 Título: **Desvinculación de crecimiento y producción de proteínas**

30 Prioridad:

30.04.2015 LU 92705
16.10.2015 EP 15190078

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2021

73 Titular/es:

ENGES BIOTECH GMBH (100.0%)
Mooslackengasse 17
1190 Wien, AT

72 Inventor/es:

MAIRHOFER, JÜRGEN;
STRIEDNER, GERALD;
GRABHERR, REINGARD y
WILDE, MONIKA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 806 985 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

Desvinculación de crecimiento y producción de proteínas

- 5 La presente invención pertenece al campo de la biotecnología recombinante, en particular al campo de la expresión de proteínas. La invención se refiere, en líneas generales, a métodos para incrementar el nivel de expresión de una proteína de interés de una célula hospedadora bacteriana en un proceso de producción. La invención se refiere en particular a mejorar la capacidad de una célula hospedadora bacteriana para expresar una proteína de interés mediante la expresión de una proteína de fago durante el proceso de producción que inhibe el crecimiento de la
- 10 célula hospedadora bacteriana. Desacoplar el crecimiento de la célula hospedadora bacteriana en la fabricación de la proteína de interés durante el proceso de producción reduce (i) la carga metabólica, (ii) la demanda de oxígeno, (iii) el desarrollo de calor metabólico y (iv) evita la respuesta de estrés causada por la expresión de proteínas heterólogas, incrementando por tanto la capacidad de una célula hospedadora de producir la proteína de interés. La presente invención también se refiere a los usos de la célula hospedadora para la expresión de proteínas, la
- 15 tecnología de cultivos celulares y también al cultivo de células hospedadoras para producir una proteína de interés.

La producción de proteínas de interés (POI; del inglés, production of proteins of interest) satisfactoria se ha conseguido con muchos hospedadores procariotas. Los ejemplos más destacados son bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces griseus*, o *Corynebacterium glutamicum*. Mientras

20 que el rendimiento de algunas proteínas se consigue fácilmente en tasas elevadas, otras muchas proteínas solo se producen en niveles bajos comparativamente.

En la última década se ha producido un gran número de productos farmacéuticos biológicos (por ejemplo, antibióticos o fragmentos funcionales de los mismos) y un número creciente está cerca de la aprobación para el uso

25 en seres humanos, pero su producción eficaz sigue siendo una tarea difícil. Las dosis activas terapéuticamente están a menudo en el orden del miligramo (mg) por administración. Por tanto, se necesitan cantidades considerables de proteínas como principios activos, que hagan una producción eficaz y rentable que merezca la pena.

Los sistemas de expresión de células bacterianas han sido mucho tiempo y todavía son, una de las herramientas

30 principales para la producción de estos tipos de moléculas. El objetivo clave de la optimización del proceso es conseguir un rendimiento elevado de producto que tenga la calidad requerida al menor coste posible, que a menudo se determina por las propiedades de un constructo o sistema de expresión específico. Por ejemplo, la expresión de proteínas recombinantes a alto nivel puede sobrepasar la capacidad metabólica de una célula hospedadora y consecuentemente conducir a la pérdida de plásmidos, transferencia de oxígeno reducida, generación de

35 subproductos tóxicos, formación de cuerpos de inclusión y/o desencadenar una respuesta de estrés que a menudo deteriora a la producción eficaz de proteínas. Se sabe también que a veces la expresión elevada de ARNm que codifica una proteína de interés no necesariamente conduce a elevadas cantidades de la proteína. Para abordar estos problemas, se han adoptado diferentes enfoques por científicos.

Por ejemplo, la expresión de una proteína recombinante se puede incrementar adicionalmente mediante la optimización de la dosis génica que codifica la proteína de interés, mediante el uso de un promotor adecuado u optimizando el uso codónico del gen que codifica la proteína de interés según la célula hospedadora empleada. Se ha demostrado que algunos otros parámetros afectan al nivel de expresión de una proteína recombinante en una

40 célula hospedadora, tales como el diseño de vectores de expresión, composición de los medios, temperatura de crecimiento, coexpresión de chaperonas, estabilidad del ARNm, iniciación de traducción y procesos epigenéticos.

45

Sin embargo, el elevado nivel de rendimiento de proteínas en células hospedadoras puede encontrarse limitado en una o más etapas diferentes, como en el plegamiento, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, transporte dentro de la célula o liberación de la célula. Todavía no se conocen completamente muchos de los mecanismos

50 implicados y no se pueden predecir basándose en el conocimiento actual del estado de la técnica, incluso cuando se encuentra disponible la secuencia de ADN del genoma completo de un organismo hospedador.

Otro problema con la producción de proteínas en células hospedadoras es una toxicidad potencial de tales proteínas para la célula hospedadora. Por consiguiente, se desarrolló el concepto llamado células quiescentes (Q; del inglés, quiescent cells) (Documento WO 2007/071959). En las células Q se pueden apagar los mecanismos celulares normales que permiten la producción de proteínas tóxicas. Para apagar las células Q se ha de añadir indol. Para algunas aplicaciones, sin embargo, el indol no es deseable. El documento WO 2017/036622 desvela un método para producir una molécula de interés en bacterias que se basa en una detención del crecimiento reversible de las bacterias a nivel de sistema de control global de crecimiento celular. Mukherjee et al. (2004): "Studies of single-chain antibody expression in quiescent *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5):3005-3012; Rowe et al. (1999): "The quiescent-cell expression system for protein synthesis in *Escherichia coli*", *American Society for Microbiology*, 65(6):2710-2715 y el documento WO 97/34996 desvelan adicionalmente unos sistemas de expresión de células quiescentes para la síntesis de proteínas en *Escherichia coli*, que son alternativos a los procedimientos de fermentación convencionales para la superproducción de proteínas. Otro concepto de cambio de la maquinaria de

55 producción de una célula hospedadora hacia la producción de una proteína de interés única es el sistema de producción de proteína única (SSP; del inglés, single protein production) en *E. coli*. Se expresa una denominada

60

65

ARNm interferasa, que escinde ARN en las secuencias de nucleótidos ACA, mientras que el ARNm que codifica la proteína de interés carece de tripletes de bases ACA (Suzuki et al. (2007), Nature Protocols 2(7), 1802.1810). Una opción adicional para dirigir la capacidad metabólica de la célula hospedadora hacia la producción de una proteína recombinante más que hacia el crecimiento, es hacer uso de la interferencia de ARN para provocar una detención de ciclos celulares y dirigir por tanto los flujos metabólicos hacia la formación de productos (Ghosh et al. (2012), Microbial Cell Factories 11:93). Hesselbach et al. (1977): "Host shutoff function of bacteriophage T7: involvement of T7 gene 2 and gene 0.7 in the inactivation of Escherichia coli RNA polymerase", Journal of Virology 24(3):736-745; Sheppard et al. (2011): "Inhibition of Escherichia coli RNAP by T7 Gp2 protein: Role of Negatively Charged Strip of Amino Acid Residues in Gp2", Journal of Molecular Biology 412(5):832-841; Beatriz et al (2010): "T7 phage protein Gp2 inhibits the Escherichia coli RNA polymerase by antagonizing stable DNA strand separation near the transcription start site", PNAS 107(5):2247-225; Schweiger et al. (1972): "Negative control of protein synthesis after infection with bacteriophage T7", PNAS 69(8):2203-2207; y Watnick et al. (2000): "The carboxyl terminus of phage HK022 Nun includes a novel zinc-binding motif and a tryptophan required for transcription termination", Genes & Development 14&9.731-739 desvelan sistemas de "apagado" de síntesis de proteínas de hospedadores.

Richardson et al. (1985): "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes", PNAS 189(1):2710-2715; los documentos EP 0178863, WO 88/10307, WO 91/05866 y WO 97/41243 desvelan sistemas de expresión para la síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli* utilizando la polimerasa T7 de fago heteróloga.

Dados los diversos problemas en la técnica anterior con respecto a la producción de proteínas en una cantidad razonable, que incluyen también las proteínas potencialmente tóxicas en células hospedadoras, a pesar de las muchas ventajas que se han conseguido a través de los últimos años, todavía hay necesidad de identificar y desarrollar métodos adicionales/alternativos para mejorar la capacidad de una célula hospedadora para producir cantidades considerables de proteínas recombinantes que incluyen proteínas potencialmente tóxicas. Por consiguiente, el problema técnico que subyace en la presente invención es cumplir con esta necesidad.

La presente invención proporciona como una solución al problema técnico nuevos medios y métodos para incrementar el rendimiento de proteínas recombinantes en células hospedadoras que son simples y eficaces y adecuadas para utilizar en métodos industriales. Estos medios y métodos se describen en el presente documento, se ilustran en los Ejemplos y se reflejan en las reivindicaciones.

En particular, los presentes inventores descubrieron un nuevo mecanismo molecular que desvincula el crecimiento de la célula hospedadora de la producción de una proteína de interés. La carga doble de una célula hospedadora causada por su proliferación y expresión simultánea de una proteína heteróloga reduce el rendimiento de una proteína de interés. De hecho, la proliferación de la célula hospedadora durante la producción de una proteína de interés plantea una sobrecarga a la célula hospedadora que da como resultado un conflicto en la distribución de los recursos celulares. De este modo, se provocan diversos efectos secundarios no deseados, como la generación de subproductos tóxicos, transferencia de oxígeno reducida e inducción de una respuesta de estrés, dando lugar finalmente a una reorientación del metabolismo celular que restringe la transcripción y la traducción y potencialmente a la muerte celular. Dado que la capacidad de síntesis celular es la base de la expresión de proteínas heterólogas, hay que tener en cuenta la capacidad de la célula hospedadora. Para reducir o suprimir los efectos secundarios no deseados de la expresión de proteínas heterólogas, los presentes inventores han desarrollado un sistema de expresión que desvincula la producción de la proteína de interés de la proliferación de la célula hospedadora, reduciendo considerable de este modo la carga sobre la célula hospedadora e incrementando el rendimiento de una proteína de interés.

Más particularmente, los presentes inventores emplean proteínas de fagos que inhiben el crecimiento de las células hospedadoras bacterianas mediante el diseño de una célula hospedadora que comprende una proteína de fago que inhibe el crecimiento de la célula hospedadora bacteriana bajo el control de un promotor inducible. Esto permite apagar la proliferación de células hospedadoras a voluntad durante el proceso de producción cuando se alcanza la densidad celular deseada, mientras se mantiene la capacidad de las células hospedadoras de producir la proteína de interés, siempre que los recursos necesarios estén presentes. Por lo tanto, se reducen el consumo de oxígeno, las necesidades nutricionales y el desarrollo de calor metabólico, se elude una respuesta de estrés y por tanto están disponibles los recursos suficientes para la producción de la proteína de interés. Un problema adicional de la expresión de proteína heteróloga es la incorporación de la proteína de interés en cuerpos de inclusión que dan como resultado una disminución de la solubilidad y de este modo, del rendimiento. Este efecto se puede evitar reduciendo la proliferación celular y la temperatura de inducción, como demostraron Vernet et al. (2010, Protein Expression and Purification, Vol. 77, Fascículo 1: 104-111) y por tanto, mediante el presente sistema de producción desacoplado de crecimiento.

Los presentes inventores han encontrado que las proteínas de fagos que inhiben el crecimiento celular son útiles para desvincular el crecimiento de una célula hospedadora y la producción de una proteína de interés de dicha célula hospedadora. De hecho, la proteína de fago idealmente hace que la célula hospedadora se detenga, mientras que un sistema de expresión que es insensible a dicha proteína de fago idealmente puede explotar totalmente la maquinaria de producción de proteínas de la célula hospedadora detenida. Por ejemplo, el bacteriófago T7 utiliza

sus proteínas gp0.7 y Gp2 para apagar la ARN polimerasa de *E. coli* tras la infección. Inmediatamente después de la infección se expresan los genes víricos tempranos de clase I del bacteriófago T7, bajo el control de promotores bacterianos, tales como la ARN polimerasa de T7, que es altamente específica para genes víricos bajo el control del promotor de T7. Entre los genes de clase I está el Gp0.7, que fosforila, entre otros, la ARN polimerasa de *E. coli* dando como resultado la terminación de la transcripción de genes tempranos y cambiando de la ARN polimerasa de la célula hospedadora a la vírica. Posteriormente, se expresa el gen vírico Gp2, uniéndose a e inhibiendo adicionalmente la subunidad beta de la ARN polimerasa del hospedador. Juntos Gp0.7 y/o Gp2 inhiben la ARN polimerasa de *E. coli* y de este modo la proliferación celular, dando como resultado una toma de la maquinaria de síntesis de proteínas bacteriana para propósitos víricos. La inhibición de la ARN polimerasa de *E. coli* por Gp2 se ha demostrado por Studier y Moffat (1986, J. Mol. Biol., 189, 113-130), si bien no consiguieron desvelar un impacto sobre la proliferación celular.

No obstante, aparte de Gp0.7 y Gp2, están disponibles tales proteínas de fagos adicionales y se han utilizado por los presentes inventores para mostrar que su concepto de utilización de una proteína de fago para desvincular el crecimiento de una célula hospedadora de su capacidad de producir una proteína de interés utilizando un sistema de producción que es insensible a tal proteína de fago. Tales proteínas de fagos adicionales son, por ejemplo, Nun, Gp6, Gp8 o A*, GP40 SP01 GP40 del fago SP01 de *Bacillus*, GP67 del fago G1 de *Staphylococcus*, GP39 del fago P23-45 de *Thermus thermophilus*, GP79 del fago PhiEco32 de enterobacterias, proteína P7 del bacteriófago Xp10 de *Xanthomonas oryzae*, proteína Alc del fago T4 de enterobacterias, proteína Asia del fago T4 de enterobacterias o proteína ykzG de *Bacillus subtilis*, que son conocidas en la técnica y también se describen en el presente documento.

Los presentes inventores adoptaron este principio funcional para el objetivo de producir una proteína de interés mediante la generación de una célula hospedadora bacteriana que comprende (i) una proteína de fago bajo el control de un promotor inducible que inhibe el crecimiento de la célula hospedadora bacteriana, (ii) una ARN polimerasa heteróloga ausente en la célula hospedadora bacteriana y (iii) una proteína de interés bajo el control de un promotor reconocido por dicha ARN polimerasa heteróloga, que de este modo facilita inhibir la proliferación celular y concentrar la capacidad de las células hospedadoras en la producción de la proteína de interés.

Los presentes inventores utilizaron, de manera ejemplar, una célula hospedadora de *E. coli* NEB10-beta que comprende la proteína Gp2 del bacteriófago T7 bajo el control de un promotor inducible de arabinosa. Se observó una inhibición del crecimiento gran dependiente de la dosis bajo la inducción de la expresión de Gp2. Posteriormente, los presentes inventores utilizaron la cepa de *E. coli* HMS174(DE3) TN7::<T7GFP> que comprende una copia integrada genómicamente del gen GFP bajo el control de un promotor de T7 y un vector de expresión que codifica el gen Gp2 bajo el control de un promotor inducible de arabinosa. Los inventores pudieron mostrar que la expresión de GFP se vio incrementada con la expresión concomitante de Gp2, en comparación con las células hospedadoras que únicamente expresan GFP.

Se debe indicar que, tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la", incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a un "casete de expresión" incluye uno o más de los casetes de expresión desvelados en el presente documento y la referencia al "método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

Salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por la presente invención.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, el término "comprenden" y sus variantes tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento integrante o de etapa o grupo de elementos integrantes o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa o grupo de elementos integrantes o de etapas. Cuando se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" puede sustituirse con la expresión "que contiene" o a veces, cuando se utiliza en el presente documento, con la expresión "que tiene".

Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de las reivindicaciones. Cuando se utiliza en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye los materiales o las etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso, en el presente documento, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazada por cualquiera de los otros dos términos.

El término "aproximado" o "aproximadamente" significa dentro de un 20 %, preferentemente dentro del 10 % y más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado. Incluye también el número concreto, por ejemplo, aproximadamente 20, incluye el 20.

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados comúnmente entendidos por los expertos en la materia. Adicionalmente, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades y los

Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan durante la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, J, Greene Publishing Associates (1992, y Suplementos de 2002); Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol I 1976 CRC Press; Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol II 1976 CRC Press. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de biología molecular y celular, bioquímica de proteínas, enzimología y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento, son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

La invención se refiere, en líneas generales, a un método para incrementar el nivel de expresión de una proteína de interés de una célula hospedadora bacteriana en un proceso de producción. La invención se refiere en particular a mejorar la capacidad de una célula hospedadora bacteriana para expresar una proteína de interés mediante la expresión de una proteína de fago durante el proceso de producción que inhibe el crecimiento de la célula hospedadora bacteriana. Desacoplar el crecimiento de la célula hospedadora bacteriana de la fabricación de la proteína de interés durante el proceso de producción reduce (i) la carga metabólica, (ii) la demanda de oxígeno, (iii) el desarrollo de calor metabólico y (iv) evita la respuesta de estrés causada por la expresión de proteínas heterólogas y por tanto incrementa la capacidad de una célula hospedadora de producir la proteína de interés. La presente invención también se refiere a los usos de la célula hospedadora para la expresión de proteínas, la tecnología de cultivos celulares y también al cultivo de células hospedadoras para producir una proteína de interés.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una célula hospedadora bacteriana que

- (i) comprende, bajo el control de un promotor inducible, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (iii) comprende bajo el control de un promotor reconocido por dicha ARN polimerasa una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se utiliza en el presente documento, tiene por objeto referirse a una célula procariota, en la que se ha introducido un ácido nucleico que comprende un casete de expresión o vector, es decir, que ha sido modificado por ingeniería genética. Un ejemplo preferido de una célula hospedadora procariota es *E. coli*. Sin embargo, también se contemplan especies de *Pseudomonas species*, *Salmonella species*, *Bacillus species*, *Lactobacillus species*, *Corynebacterium species*, *Microbacterium species* o *Actinomycetes*. Debe entenderse que tales términos tienen por objeto referirse no solo a la célula concreta, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así, se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal como se utiliza en el presente documento. La célula hospedadora recombinante puede ser una célula hospedadora aislada, preferentemente de cultivo celular.

En una realización preferida de la presente invención la célula hospedadora bacteriana es *E.coli*.

Un experto en la materia es consciente de las técnicas conocidas de modificación por ingeniería genética para generar una célula hospedadora bacteriana de la presente invención. Por ejemplo, están disponibles diversos kits para la modificación por ingeniería genética de una célula hospedadora bacteriana para la integración de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos en un genoma bacteriano, de forma aleatoria o dirigida; véase, por ejemplo, Zhang et al. (1998), Nature Genetics 20, 123-128 o Sharan et al. (2009), Nature Protocols 4(2), 206-223. Un experto en la materia es consciente de las técnicas para la transformación de una célula hospedadora bacteriana, así como con cualquier otra técnica de clonación que pueda emplear para la generación de elementos extracromosómicos tales como plásmidos, cósmidos, bácnidos, etc.

El término "crecimiento" de la célula hospedadora como se utiliza en el presente documento significa un incremento del número de células debido a la división celular.

Una secuencia promotora como se utiliza en el presente documento es una secuencia no codificante de control de expresión insertada preferentemente en las proximidades del inicio de la secuencia codificante del casete de expresión y que regula su expresión. Puesto de una manera simplista pero básicamente correcta, es la interacción del promotor con diversas proteínas especializadas llamadas factores de transcripción la que determina si una secuencia codificante puede o no transcribirse y finalmente traducirse en la proteína real codificada por el gen. Se reconocerá por un experto en la materia que puede utilizarse cualquier promotor compatible para la expresión recombinante en las células hospedadoras. El promotor en sí mismo puede estar precedido de una secuencia activadora en dirección 5', una secuencia potenciadora o una combinación de las mismas. Se conocen estas secuencias en la técnica por ser cualquier secuencia de ADN que muestra una fuerte actividad transcripcional derivada de un gen que codifica una proteína extracelular o intracelular. Se reconocerá por un experto en la materia que las secuencias de terminación y poliadenilación se pueden derivar adecuadamente de las mismas secuencias que el promotor.

La expresión "promotor inducible" como se utiliza en el presente documento se refiere a un promotor que regula la expresión de un gen operativamente ligado o ARN funcional en respuesta a la presencia o ausencia de un estímulo endógeno o exógeno. Tales estímulos pueden ser, pero no se limitan a, productos químicos o señales ambientales.

Las secuencias de control de expresión "operativamente ligadas" se refieren a una unión en la que la secuencia de control de la expresión es contigua al casete de expresión, así como las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar la expresión del casete de expresión.

La expresión "secuencia de nucleótidos" o "molécula de ácidos nucleicos" como se utiliza en el presente documento se refiere a una forma polimérica de nucleótidos (es decir, polinucleótidos) que normalmente están unidos de una desoxirribosa o ribosa a otra. La expresión secuencia de nucleótidos preferentemente incluye formas monocatenarias o bicatenarias de ADN o ARN. Una molécula de ácido nucleico de esta invención puede incluir cadenas de ARN tanto sentido como antisentido (que contienen ribonucleótidos), ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Se pueden modificar química o bioquímicamente o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como uniones no cargadas (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.), uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), fracciones colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.) También se incluyen moléculas sintéticas que mimetizan polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que las uniones peptídicas reemplazan a uniones fosfato en el esqueleto de la molécula.

En este sentido, un ácido nucleico que es un producto de expresión es preferentemente un ARN, mientras que un ácido nucleico que se introduzca en una célula es preferentemente ADN, por ejemplo, ADN genómico o ADNc.

El ácido nucleico puede ser de cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, tricatenario, cuádruplexado, parcialmente bicatenario, ramificado, horquillado, circular o con forma de candado.

Un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Dicho término no se entiende en el presente documento como referido a una longitud específica de la molécula y por tanto en el presente documento se utiliza de manera intercambiable con el término "proteína". Cuando se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" o "proteína" también se incluye un "polipéptido de interés" o "proteína de interés" que se expresa mediante los casetes de expresión o vectores que pueden aislarse de las células hospedadoras de la invención. Una proteína de interés también incluye proteínas que pueden ser potencialmente dañinas o incluso tóxicas para las células hospedadoras.

Entre los ejemplos de una proteína de interés están las enzimas, más preferentemente una enzima amilolítica, una enzima lipolítica, una enzima proteolítica, una enzima celulítica, una oxidorreductasa o una enzima que degrada la pared celular vegetal; y más preferentemente, una enzima que tiene una actividad seleccionada del grupo que consiste en aminopetidasa, amilasa, amiloglucosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa ciclodextrina, desoxirribonucleasa, esterasa, galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, glucosa oxidasa, glucosidasa, haloperoxidasa, hemicelulasa, invertasa, isomerasa, lacasa, ligasa, lipasa, liasa, manosidasa, oxidasa, pectinasa, peroxidasa, fitasa, fenoloxidasa, polifenoloxidasa, proteasa, ribonucleasa, transferasa, transglutaminasa y xilanas. Asimismo, una proteína de interés puede ser también un factor de crecimiento, citocina, receptores, ligandos de receptores, proteínas terapéuticas tales como interferones, BMP, proteínas GDF, factores de crecimiento de fibroblastos, péptidos tales como inhibidores de proteínas, proteínas de membrana, proteínas asociadas a membrana, hormonas de péptidos/proteínas, toxinas peptídicas, antitoxinas peptídicas, anticuerpo o fragmentos funcionales del mismo tales como Fab o F(ab)₂ o derivados de un

anticuerpo tales como anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, scFvs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de dominio único tales como Nanocuerpos o anticuerpos de dominio (dAbs) o una anticalina u otros.

5 Un "polipéptido" como se utiliza en el presente documento abarca proteínas tanto de origen natural como de origen no natural y fragmentos, mutantes, derivados y análogos de los mismos. Un polipéptido homólogo (nativo) o heterólogo para la célula hospedadora pueden ser polipéptidos. El polipéptido de interés puede abarcar también un polipéptido nativo para la célula hospedadora, que está codificado por una secuencia de ácido nucleico, cuya expresión se controla por una o más secuencias de control ajenas a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Los polipéptidos pueden ser de cualquier longitud. Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad o bioactividad. Un "péptido" abarca análogos y miméticos que mimetizan la función estructural y por tanto, la función biológica.

15 Los polipéptidos pueden formar adicionalmente dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula polipeptídica. Las moléculas de polipéptido que forman tales dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes se denominan consecuentemente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc.

20 Adicionalmente, un polipéptido puede comprender varios dominios diferentes, teniendo cada uno una o más actividades diferentes.

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención o proteína de interés, puede obtenerse de cualquier procariota, eucariota u otra fuente.

25 Como se describe en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención o proteína de interés está regulada preferentemente por un promotor. Dicho promotor se transcribe de forma específica preferentemente por una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora y cuya expresión puede ser inducible. Sin embargo, dicha ARN polimerasa también puede expresarse constitutivamente.

30 Cuando se utiliza en el presente documento, la expresión "crecimiento de una célula hospedadora bacteriana" significa que una célula hospedadora al menos está deteriorada en su crecimiento en comparación con una célula hospedadora que no expresa una proteína de fago que inhibe el crecimiento de una célula hospedadora bacteriana y que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana y que comprende bajo el control de un promotor reconocido por dicha ARN polimerasa una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés. En particular, no se excluye que tal célula hospedadora que no expresa dicha proteína de fago, no obstante, comprende bajo el control de un promotor inducible una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana. De hecho, tal célula hospedadora es una célula de referencia preferida, por ejemplo, para determinar el deterioro del crecimiento, como se ha descrito anteriormente. Dicho de otra manera, cuando debe determinarse el deterioro del crecimiento, el experto puede comparar fácilmente una célula hospedadora de la presente invención cuando se induce la expresión de dicha proteína de fago frente a tal hospedador cuando la expresión de dicha proteína de fago no se induce.

45 Cuando se inhibe el "crecimiento de una célula hospedadora bacteriana" como se describe en el presente documento, el crecimiento incluye preferentemente la transcripción, replicación de ADN y/o división celular. Por consiguiente, se prefiere que una proteína de fago, particularmente una o más de las proteínas de fagos descritas en el presente documento, inhiba la transcripción, replicación de ADN y/o división celular.

50 Cuando se hace referencia en el presente documento a una "proteína de fago" es una proteína de un (bacterió)fago. Un fago infecta bacterias y es capaz de replicarse en dicha bacteria. Cuando infecta una bacteria y se replica en dicha bacteria, un fago puede tener una o más proteínas que inhiben el crecimiento de dicha bacteria, por ejemplo, mediante la inhibición de la transcripción, de la replicación de ADN y/o de la división celular para explotar completamente la maquinaria de síntesis de proteínas de dicha bacteria.

55 Por consiguiente, la presente invención se puede poner en práctica con cualquier proteína de fago que efectúe la inhibición del crecimiento de la célula hospedadora bacteriana al provocar, por ejemplo, un apagado de la transcripción del hospedador. En este caso, la célula hospedadora bacteriana comprende, bajo el control de un promotor inducible, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que provoca un apagado de la transcripción de dicha célula hospedadora bacteriana. La expresión "apagado de la transcripción del hospedador" como se utiliza en el presente documento se refiere a la inhibición de la transcripción de la célula hospedadora bacteriana. Las proteínas que pueden utilizarse para provocar un apagado de la transcripción se han descrito en el presente documento, tales como Gp2, GP0.7, Nun, Gp6, Gp8, A*, subunidad Epsilon de YkzG. Sin embargo, se pueden utilizar proteínas adicionales que efectúen un apagado de la transcripción del hospedador también para poner en práctica la presente invención. Tales proteínas son por ejemplo, GP40 SP01 GP40 del fago SP01 de Bacillus, GP67 del fago G1 de Staphylococcus, GP39 del fago P23-45 de Thermus thermophilus, GP79 del fago

PhiEco32 de enterobacterias, proteína P7 del bacteriófago Xp10 de Xanthomonas oryzae, proteína Alc del fago T4 de enterobacterias, proteína Asia del fago T4 de enterobacterias.

De manera ejemplar, el Ejemplo 1 en conjunción con la Fig. 1 ilustra que la inhibición de la transcripción de la célula hospedadora, mediante la expresión inducida de la proteína Gp2 de fago que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, inhibe el crecimiento de la célula hospedadora como una función de la molécula inductora arabinosa.

Por consiguiente, la proteína de fago de la presente invención es preferentemente

(i) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(ii) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(iii) una proteína que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(iv) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana;

(v) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o

(vi) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana;

(vii) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o

(b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

5 (viii) una proteína que provoca el apagado de la transcripción del hospedador, en la que dicha proteína es

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o un fragmento de las mismas que provoca el apagado de la transcripción del hospedador; o

10 (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 y que provoca el apagado de la transcripción del hospedador.

15 En una realización preferida adicional de la presente invención, dicha secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana, dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicha ARN polimerasa, dicha secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, se integra en el genoma de dicha célula hospedadora o está comprendida por un vector extracromosómico.

20 El término "vector" como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de un ácido nucleico en la que se puede insertar o clonar un casete de expresión que comprende un gen de la presente invención o un gen que codifica la proteína de interés. Asimismo, el vector puede codificar un gen de resistencia a antibióticos que confiere selección de la célula hospedadora. Preferentemente, el vector es un vector de expresión.

25 El vector puede ser capaz de replicación autónoma en una célula hospedadora (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en la célula hospedadora). El vector puede tener una configuración lineal, circular o superenrollada y puede formar complejo con otros vectores u otro material para ciertos fines.

30 Los vectores utilizados en el presente documento para expresar un casete de expresión que comprende un gen de la presente invención o un gen que codifica la proteína de interés, normalmente contienen elementos de control transcripcionales adecuados para dirigir la transcripción tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, señales de pausa o terminación de la transcripción como elementos de un casete de expresión. Para la expresión adecuada de los polipéptidos, en el vector se incluyen preferentemente elementos de control traduccionales adecuados, tales como, por ejemplo, regiones 5' no traducidas que llevan a estructuras de tapa 5' adecuadas para reclutar ribosomas y codones de terminación para terminar el proceso de traducción. En particular, se puede transcribir la secuencia de nucleótidos que sirve como los genes marcadores seleccionables así como la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, bajo el control de elementos de transcripción presentes en promotores adecuados. Los transcritos resultantes de los genes marcadores seleccionables y los de la proteína de interés albergan elementos de traducción funcionales que facilitan niveles sustanciales de expresión de la proteína (es decir, traducción) y la terminación de la traducción adecuada.

40 El vector puede comprender un polienlazador (sitio de clonación múltiple), es decir, un segmento corto de ADN que contiene muchos sitios de restricción, una característica estándar de muchos plásmidos utilizados para clonación molecular. Los sitios de clonación múltiple contienen típicamente más de 5, 10, 15, 20, 25 o más de 25 sitios de restricción. Los sitios de restricción dentro de un SCM (en inglés, MCS) son únicos típicamente (es decir, se encuentran solo una vez dentro de un plásmido particular). Los SCM se utilizan habitualmente durante procedimientos que implican clonación o subclonación molecular.

50 Un tipo de vector es un plásmido, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden añadir segmentos de ADN adicionales a través de ligadura o mediante clonación sin restricciones. Otros vectores incluyen cósmidos, los cromosomas artificiales de bacterias (BAC; del inglés, bacterial artificial chromosomes), cromosomas artificiales de levaduras (YAC; del inglés, yeast artificial chromosomes) o minicromosomas. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral.

55 La invención se refiere adicionalmente a un vector que se puede integrar en el genoma de las células hospedadoras y de este modo, replicarse junto con el genoma de las células hospedadoras. El vector de expresión puede comprender un sitio de restricción predefinido, que se puede utilizar para linealizar el ácido nucleico del vector antes de la transfección. El experto en la materia sabe cómo integrarlo en el genoma. Por ejemplo, es importante cómo situar el sitio de restricción de linealización, porque dicho sitio de restricción determina dónde se abre/linealiza el ácido nucleico del vector y por tanto determina el orden/organización de los casetes de expresión cuando el constructo se integra en el genoma de la célula hospedadora.

60 Un gen de resistencia a antibióticos, según la invención, quiere decir un gen que proporciona las células transformadas con una ventaja de selección (por ejemplo, resistencia contra un antibiótico) mediante la expresión del correspondiente producto génico. El producto génico confiere una característica a la célula que expresa el gen de resistencia a antibióticos que le permite distinguirse de células que no expresan el gen de resistencia a antibióticos (es decir, selección de células) si el antibiótico, para el que el producto génico confiere resistencia, se aplica al medio de cultivo celular. La resistencia mediante el producto génico a la célula puede conferirse a través de diferentes

mecanismos moleculares (por ejemplo, la inactivación del fármaco, flujo incrementado).

El casete de expresión que comprende un gen de la presente invención o gen que codifica la proteína de interés, se inserta en el vector de expresión como un constructo de ADN. Este constructo de ADN se puede hacer de manera recombinante a partir de una molécula de ADN sintética, una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc o una combinación de las mismas. El constructo de ADN se hace preferentemente ligando los distintos fragmentos unos a otros de acuerdo con las técnicas estándar conocidas en la técnica.

El casete de expresión que comprende un gen de la presente invención o gen que codifica la proteína de interés, puede ser parte del vector de expresión. Preferentemente, el vector de expresión es un vector de ADN. El vector comprende convenientemente secuencias que facilitan la expresión adecuada del gen que codifica la proteína de interés y el gen de resistencia a antibióticos. Estas secuencias comprenden típicamente, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de inicio de la transcripción, sitios de terminación de la transcripción y funciones de poliadenilación como se describe en el presente documento.

Los casetes de expresión pueden comprender un potenciador y/o un intrón. Habitualmente, los intrones se sitúan en el extremo 5' del marco de lectura abierto. Por consiguiente, un intrón puede estar comprendido en el casete de expresión para expresar el polipéptido de interés con el fin de incrementar la tasa de expresión. Dicho intrón puede estar localizado entre el promotor y/o elemento promotor/potenciador y el extremo 5' del marco de lectura abierto del polipéptido a expresar. Se conocen varios intrones adecuados en la técnica que se pueden utilizar en conjunción con la presente invención.

El casete de expresión o vector según la invención que está presente en el hospedador puede estar integrado en el genoma del hospedador o se puede mantener de alguna forma extracromosómicamente.

Asimismo, los casetes de expresión pueden comprender un sitio de terminación de la transcripción adecuado. Esto, como transcripción continuada de un promotor en dirección 5' a través de una segunda unidad de transcripción puede inhibir la función del promotor en dirección 5', un fenómeno conocido como oclusión del promotor o interferencia transcripcional. Este caso se ha descrito tanto en procariotas como en eucariotas. La colocación adecuada de las señales de terminación transcripcionales entre dos unidades de transcripción puede evitar la oclusión del promotor. Los sitios de terminación de la transcripción están bien caracterizados y se ha demostrado que su incorporación en vectores de expresión tiene múltiples efectos beneficiosos sobre la expresión génica.

Los términos "5'" y "3'" utilizados en el presente documento se refieren a una convención utilizada para describir características de una secuencia de nucleótidos relacionada con la posición de elementos genéticos y/o la dirección de acontecimientos (5' a 3'), tales como, por ejemplo, la transcripción mediante ARN polimerasa o traducción mediante el ribosoma que procede en dirección 5' a 3'. Son sinónimos en dirección 5' (en inglés, upstream) y en dirección 3' (en inglés, downstream). De forma convencional, las secuencias de nucleótidos, mapas genéticos, tarjetas de vectores y secuencias de ARN se dibujan con 5' a 3' de izquierda a derecha o la dirección 5' a 3' se indica con flechas, en los que las puntas de flecha apuntan a la dirección 3'. Por consiguiente, 5' (en dirección 5') indica elementos genéticos situados hacia el lado izquierdo y 3' (en dirección 3') indica elementos genéticos situados hacia el lado derecho, cuando se sigue esta convención.

El término "expresión" como se utiliza en el presente documento quiere decir la transcripción de una secuencia de nucleótidos. Dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína preferentemente. Por consiguiente, dicho término incluye también la producción de ARNm (como producto de transcripción a partir de una secuencia de nucleótidos) y la traducción de este ARNm para producir el producto génico correspondiente, tal como un polipéptido o una proteína.

La ARN polimerasa es heteróloga para la célula hospedadora bacteriana ventajosamente, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha ARN polimerasa. "Heteróloga" significa que la ARN polimerasa no está presente de forma natural en dicha célula hospedadora bacteriana, es decir, dicha célula hospedadora bacteriana no comprende de forma natural dicha ARN polimerasa, a menos que una secuencia de nucleótidos que codifica dicha ARN polimerasa se introduzca en dicha célula hospedadora bacteriana de acuerdo con la enseñanza de la presente invención por los medios y métodos conocidos en la técnica. La ARN polimerasa es por tanto insensible idealmente a una proteína de fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana.

Preferentemente, la ARN polimerasa es la ARN polimerasa del bacteriófago T3, ARN polimerasa del bacteriófago T7, ARN polimerasa del T7 ortogonal modificado por ingeniería genética, ARN polimerasa del bacteriófago SP6 o ARN polimerasa del bacteriófago Xp10. Se describen ARN polimerasas adicionales, tales como las polimerasas del T7 ortogonal modificado por ingeniería genética, en Temme et al. (2012), *Nucleic Acids Research* 40(17), 8773-8781.

En una realización preferida de la presente invención la secuencia de nucleótidos que codifica la ARN polimerasa está bajo el control de un promotor inducible o constitutivo. En el presente documento se describen ejemplos de promotores inducibles en el contexto de un promotor inducible que controla una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana. Estos

promotores inducibles son también ejemplos preferidos para un promotor inducible que controla la ARN polimerasa como se describe en el presente documento más adelante.

Preferentemente, el promotor inducible que controla una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana se regula por arabinosa, IPTG, triptófano, xilosa, ramnosa, fosfatos o proteína cl del fago lambda.

En cuanto a los promotores inducibles que controlan una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana como o que controlan una secuencia de nucleótidos que codifica dicha ARN polimerasa, es preferible que se apliquen los mismos promotores inducibles. En el presente documento se describen los ejemplos preferidos. Esta realización preferida permite inducir la expresión simultáneamente de la proteína de fagos y la ARN polimerasa para desvincular crecimiento y producción de proteínas. Sin embargo, por supuesto, se pueden utilizar también promotores inducibles diferentes de acuerdo con la enseñanza de la presente invención.

En una realización preferida de la célula hospedadora bacteriana, dicha célula hospedadora tiene un operón de arabinosa no funcional.

La presente invención también proporciona una preparación de una célula hospedadora bacteriana que

- (i) comprende, bajo el control de un promotor inducible, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago como se define en el presente documento que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana.

Una "preparación de una célula hospedadora bacteriana" como se utiliza en el presente documento es cualquier preparación que está ventajosamente libre de células hospedadoras bacterianas intactas, vivas, pero que tiene la capacidad de transcribir y traducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, con lo cual dicha secuencia de nucleótidos está bajo el control de un promotor reconocido por la ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana a partir de la cual se deriva la preparación. Tal preparación puede, por ejemplo, prepararse mediante lisis leve de células hospedadoras bacterianas o mediante fuerzas mecánicas tales como someter tales células hospedadoras bacterianas a una prensa francesa.

También se desvela en el presente documento dentro del contexto de la invención un método para la producción de una célula hospedadora como se describe en el presente documento, que comprende transformar una célula hospedadora bacteriana con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana como se define en el presente documento, una secuencia de nucleótidos que codifica ARN polimerasa de T7 y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

La expresión "que transforma" como se utilizan en el presente documento significa la alteración del genotipo de una célula hospedadora mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos no se origina necesariamente a partir de una fuente diferente, pero será, en algún momento, ajena a la célula en la que se va a introducir.

En un aspecto adicional, la presente invención comprende un método para la producción de una proteína de interés, que comprende cultivar la célula hospedadora bacteriana como se describe en el presente documento, en condiciones adecuadas y obtener dicha proteína de interés.

En la técnica existe un gran número de métodos adecuados para producir polipéptidos en las células hospedadoras de la invención. Convenientemente, la proteína producida se extrae del medio de cultivo, de lisados de la célula hospedadora cultivada o de membranas (biológicas) aisladas mediante técnicas establecidas. Por ejemplo, un casete de expresión que comprende, entre otros, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés se puede sintetizar mediante PCR e insertarse en el vector de expresión. Posteriormente, se puede transformar una célula con el vector de expresión. Después de eso, se cultiva la célula para producir/expresar la(s) proteína(s) deseada(s), que se aísla(n) y purifica(n). Por ejemplo, el producto puede recuperarse de la célula hospedadora y/o del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales, incluyendo, pero sin limitarse a, lisis celular, rotura de las células hospedadoras, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción, evaporación, secado por pulverización o precipitación. La purificación se puede realizar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, de cromatoenfoco y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico) o extracción.

El "aislamiento de la proteína de interés" se refiere a la separación de la proteína de interés producida durante o después de la expresión del vector introducido. En el caso de proteínas o péptidos como productos de expresión, dichas proteínas o péptidos, además de la secuencia necesaria y suficiente para que la proteína sea funcional,

puede comprender secuencias de aminoácidos de extremos N o C terminales adicionales. Se hace referencia a tales proteínas como proteínas de fusión.

Cuando un polipéptido de interés se expresa en una célula hospedadora de la invención, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido adaptando el uso codónico de dicha secuencia de nucleótidos para cumplir con la frecuencia de uso del codón preferido de dicha célula hospedadora. Tal como se utiliza en el presente documento, "frecuencia de uso codónico preferido" se refiere a la preferencia que exhibe la célula hospedadora de la invención en el uso de codones nucleotídicos para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, se divide el número de apariciones de ese codón en el gen por el número total de apariciones de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. De forma similar, se puede calcular la frecuencia de uso codónico preferido mostrada por una célula hospedadora promediando la frecuencia del uso codónico preferido en un gran número de genes expresados por la célula hospedadora. Es preferible que este análisis se limite a genes que están altamente expresados por la célula hospedadora. El porcentaje de desviación de la frecuencia de uso codónico preferido para un gen sintético de aquel empleado por una célula hospedadora se calcula determinando primero el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un codón único de aquel de la célula hospedadora seguido por la obtención de la desviación promedio sobre todos los codones. Como se define en el presente documento, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATG y TGG).

Se puede utilizar una etiqueta para permitir la identificación y/o purificación de la proteína de interés. Por consiguiente, es preferible que una proteína de interés comprenda una etiqueta. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés preferentemente codifica también una etiqueta que está ventajosamente fusionada genéticamente en el marco para la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de interés. Dicha etiqueta puede estar en el extremo C o N terminal de dicha proteína de interés. Entre los ejemplos de etiquetas que pueden usarse de acuerdo con la invención se incluyen, pero no se limitan a, HAT, FLAG, c-myc, antígeno de hemaglutinina, etiquetas His (por ejemplo, 6xHis), etiqueta flag, etiqueta strep, etiqueta strepII, etiqueta TAP, dominio de unión de quitina (CBD; del inglés, chitin binding domain), proteína de unión a maltosa, inmunoglobulina A (IgA), etiqueta His-6, etiqueta glutatión- S-transferasa (GST), etiqueta de proteína de unión íntima y estreptavidina (SBP).

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para incrementar el rendimiento de una proteína de interés, que comprende cultivar una célula hospedadora bacteriana como se define en el presente documento, en condiciones adecuadas y obtener dicha proteína de interés.

El término "rendimiento" como se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad de proteína de interés que, por ejemplo, se recoge de la célula hospedadora recombinante y los rendimientos incrementados se pueden deber a cantidades incrementadas de producción o secreción de la proteína de interés o de la proteína modelo por la célula hospedadora. Se puede representar el rendimiento mediante mg de proteína/g de biomasa (medida como peso celular seco o peso celular húmedo) de una célula hospedadora. El término "valorar" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a la similitud de la cantidad de proteína de interés producida o de proteína modelo, presentada como g de proteína/l de caldo de cultivo (incluyendo las células). Se puede determinar un incremento en el rendimiento cuando el rendimiento obtenido de una célula hospedadora recombinante, cuya proliferación se ha inhibido temporalmente durante el proceso de producción, se compara con el rendimiento obtenido de una célula hospedadora cuya proliferación no se modificó.

De manera ejemplar, El Ejemplo 3 junto con la Fig. 3 ilustran que la expresión inducida de la proteína Gp2 de fago da como resultado la expresión incrementada de la proteína modelo GFP.

Preferentemente, los métodos descritos en el presente documento incluyen las etapas de cultivo

- (a) crecimiento de las células bacterianas hasta una densidad de al menos 20 g/l de masa celular seca (CDM; del inglés, cell dry mass);
- (b) inducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fago que inhibe el crecimiento de la célula hospedadora;
- (c) alimentación de células bacterianas con una tasa de alimentación lineal constante que permitiría una tasa de crecimiento inicial de $0,05 \text{ h}^{-1}$; y
- (d) cultivo adicional de dichas células bacterianas durante al menos 12 horas.

En una realización preferida adicional, la presente invención comprende un método para incrementar el rendimiento de una proteína de interés, que comprende transformar un hospedador bacteriano que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, dicha secuencia de nucleótidos está bajo el control de un promotor que dicha ARN polimerasa reconoce, con una secuencia bajo el control de un promotor inducible, dicha secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana.

Un método para la producción de una proteína de interés, que comprende poner en contacto en condiciones adecuadas la preparación como se describe en el presente documento con una secuencia de nucleótidos que comprende, bajo el control de un promotor reconocido por una ARN polimerasa como se ha definido en el presente documento, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

5 Asimismo, los métodos descritos en el presente documento se refieren a una proteína de interés que es tóxica para las células, afecta negativamente a la viabilidad, el crecimiento celular y/o la división celular.

10 El término "tóxico" como se utiliza en el presente documento significa que la proteína de interés o derivado de la misma o un precursor de la misma, tiene un efecto adverso en la célula hospedadora sobre su expresión o se metaboliza en un derivado que tiene un efecto adverso en la célula hospedadora. Un ejemplo de un efecto adverso es la inhibición del crecimiento. El término incluye también la muerte de célula hospedadora.

15 En una realización adicional los métodos de la presente invención comprenden modificar la proteína de interés y/o formular la proteína de interés en una composición que incluya al menos un componente adicional.

20 La "expresión modificar la proteína de interés" como se utiliza en el presente documento puede ser, pero no se limita a, fusión con otra proteína, adición de un marcador, truncamiento de la proteína de interés, adición de modificaciones postraduccionales, por ejemplo, acetilación, glucosilación, biotilación, oxidación, adición de nucleótidos, amidación, adición de aminoácidos, alquilación, palmitoilación y otros, reticulación de la proteína de interés, modificación química de la proteína de interés, por ejemplo, pegilación, conversión de aminas en sulfhidrilos, bloqueo de grupos sulfhidrilo u otros. Un "marcador" puede ser un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente, un marcador radioactivo, un marcador enzimático y similares.

25 En el presente documento se ha previsto también que los métodos de la presente invención se puedan utilizar para modificar la proteína de interés mediante la incorporación de compuestos en la proteína de interés. La incorporación de dichos compuestos se puede utilizar para el marcaje de la proteína de interés. Esto puede resultar especialmente útil para el análisis de la estructura de la proteína. Son ejemplos de dichos compuestos C₁₂, N₁₅, D₂O o una cualquier combinación de los mismos. Los métodos de la presente proporcionan la ventaja de que dichos compuestos se utilizarán exclusivamente en la producción de la proteína de interés pero no en la producción de proteínas celulares. Por lo tanto, se necesitarán menos compuestos marcadores para marcar una proteína de interés.

30 Asimismo, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para modificar la proteína de interés mediante la incorporación de aminoácidos no canónicos en la proteína de interés. Un ejemplo de tales aminoácidos no canónicos son los fluoroaminoácidos (por ejemplo, 4-fluoro-L-treonina), que puede utilizarse para la fluoración de una proteína de interés. Un aminoácido no canónico se puede incorporar de forma global en la proteína mediante una sustitución específica de restos de uno o más aminoácidos canónicos por sus análogos no canónicos o específicos de sitio mediante la inserción de un codón de terminación ámbar en la secuencia de codificación de la proteína de interés. Un ARNt ortogonal reconoce dicho codón de terminación ámbar (por ejemplo, mediante un ARNt supresor mal acilado), en el que dicho ARNt ortogonal se carga predominantemente con un aminoácido no canónico mediante una ARNt sintetasa ortogonal.

45 La expresión "que formula la proteína de interés en una composición" como se utiliza en el presente documento significa que la proteína de interés se mezcla con uno o más componentes que, por ejemplo, protege(n) la proteína de interés de la degradación, desnaturalización, de ambientes hostiles o de que la hidrolicen proteasas o de que se diluya la proteína de interés o que mejora(n) la actividad farmacológica de la proteína de interés cuando se administra como un fármaco a un paciente o que es(son) ventajoso(s) en el proceso de fabricación u otros.

50 En una realización preferida de la presente invención, se modifica dicha proteína de interés con un marcador.

El término "marcador" como se utiliza en el presente documento puede ser, pero no se limita a una etiqueta, por ejemplo, Biotina, etiqueta Strep II, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta Myc, etiqueta poli(His), glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP) y otras, o una sonda fluorescente, por ejemplo, GFP, RFP, BFP, YFP, mCherry, FITC, TRITC, flúor Dylight, PE, puntos Quantum, flúor Alexa y otros, o una enzima, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, betagalactosidasa y otras, o una sonda de sitio activo, por ejemplo, sonda de hidrolasa serina destiobiotina-FP y otras.

60 Un método para la producción de un compuesto de interés, comprende cultivar la célula hospedadora bacteriana como se describe en el presente documento y añadir un compuesto que se convierte y/o se usa por dicha célula hospedadora bacteriana para la producción de dicho compuesto de interés.

65 La expresión "compuesto de interés" como se utiliza en el presente documento puede ser, pero no se limita a, precursores o moléculas de bloques de construcción para plásticos, tal como la conversión de biciclo [3.2.0] -hept-2-en-6-ona en lactonas, alcoholes, tal como conversión de compuestos de carbonilo proquiral en quiral, conversión de ácido ferúlico en coniferil aldehído en alcohol coniferílico, o conversión de eugenol en ácido ferúlico en alcohol

coniferílico en vainillina.

La invención se refiere adicionalmente al uso de la célula hospedadora o la preparación como se describe en el presente documento para la preparación de una proteína de interés.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de la célula hospedadora o de la preparación como se describe en el presente documento para incrementar el rendimiento de una proteína de interés.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fago como se define en el presente documento para incrementar el rendimiento de una proteína de interés en una célula hospedadora.

El uso de una proteína de fago como se describe en el presente documento, en el que la proteína de interés está bajo el control de un promotor de T7 y dicha célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la ARN polimerasa de T7.

Figuras

Figura 1: La expresión inducida de Gp2 inhibe el crecimiento de células hospedadoras de la cepa NEB10-beta de *E.coli* de forma dependiente de la dosis.

Se clonó la secuencia que codifica Gp2 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en el plásmido f de copia baja pKLJ12 (Jones y Keasling (1998), *Biotechnol Bioengineer* 59: 659-665). El plásmido pKLJ12+Gp2 se transformó en la cepa de *E.coli* NEB10-beta que comprende una mutación araD139. En consecuencia, NEB10-beta no es capaz de metabolizar el inductor arabinosa. La adición de diferentes concentraciones de arabinosa y de este modo la expresión de Gp2 causa la inhibición de la proliferación de una forma dependiente de la dosis.

Figura 2: La adición de arabinosa no tiene efecto sobre el crecimiento de células hospedadoras.

Con el fin de excluir cualquier efecto del compuesto arabinosa sobre el crecimiento de células hospedadoras se ha empleado un derivado del plásmido pKLJ12+Gp2 al que le falta el sitio de unión al ribosoma (RSB) del casete de expresión Gp2. En consecuencia, la expresión de Gp2 no se puede inducir y por lo tanto no se observó diferencia en la proliferación con o sin arabinosa.

Figura 3: La expresión inducida de Gp2 incrementa el nivel de expresión de la proteína modelo GFP.

La cepa de *E.coli* HMS174(DE3) TN7::<T7GFP>, que comprende la secuencia codificante de GFP bajo el control de un promotor de T7 y una ARN polimerasa de T7 bajo el control de un promotor inducible de IPTG, se transformó con el plásmido pKLJ12+Gp2 que alberga la secuencia que codifica Gp2 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Tres experimentos consecutivos mostraron que las células hospedadoras inducidas con IPTG y arabinosa, que expresan ARN polimerasa de T7 y Gp2, expresaron GFP en mayor medida en comparación con las células hospedadoras que se indujeron con IPTG, únicamente y por tanto expresaron ARN polimerasa de T7 pero no Gp2.

Figura 4: La expresión de Gp2 del inserto pKLJ12+Gp2 sin el vector incrementa la expresión de GFP.

La cepa de *E.coli* HMS174(DE3) TN7::<T7GFP>, que comprende la secuencia codificante de GFP bajo el control de un promotor de T7 y una ARN polimerasa de T7 bajo el control de un promotor inducible de IPTG, se transformó con el inserto de pKLJ12+Gp2 que comprende el casete de expresión Gp2. En dos de tres casos, la transformación del casete de expresión Gp2 dio como resultado una expresión de GFP incrementada, 3 h después de la inducción de IPTG.

Figura 5: Secuencias de aminoácidos de proteínas (de fagos) ejemplares, pero sin embargo preferidas, que inhiben el crecimiento de una célula hospedadora bacteriana.

Figura 6: Proceso de fermentación de referencia carente de expresión de Gp2.

En el proceso de fermentación de referencia no se expresa Gp2 y por tanto las células continúan creciendo durante la producción de la proteína modelo GFP, según lo esperado. En consecuencia, se incrementan la CDM (masa celular seca) y la CDM sin proteína recombinante durante todo el proceso de fermentación. La expresión inducida de GFP da como resultado un incremento constante, tanto de GFP soluble específica como de GFP soluble total durante todo el proceso de fermentación.

Figura 7: Ejemplo de proceso de fermentación en el que el crecimiento y la producción de proteínas se han desvinculado mediante la expresión de Gp2.

En el ejemplo, la expresión de Gp2 del proceso de fermentación provoca una detención del crecimiento de las células. En consecuencia, la CDM sin la proteína recombinante permanece constante bajo la inducción de la expresión de Gp2 en el punto temporal de 11 h, mientras que la CDM total se incrementa moderadamente debido a la producción de GFP recombinante. Ambas, la GFP soluble específica y la GFP soluble total se incrementan durante el transcurso del proceso de fermentación a pesar de la detención del crecimiento de las células.

Figura 8: La expresión de Gp2 incrementa el nivel de expresión de GFP y la proporción de GFP respecto a la proteína de célula hospedadora (PCH; en inglés, HCP) soluble en el sobrenadante.

El gel de SDS PAGE teñido con coomassie muestra un incremento de GFP soluble en el sobrenadante (S) utilizando el sistema desacoplado de crecimiento (*E. coli* BL21(DE3) con proteína Gp2 inducible integrada en el genoma en comparación con un sistema estándar (*E. coli* BL21(DE3) sin Gp2 inducible integrada en el genoma). Asimismo, la cantidad relativa de GFP respecto a HCP (excluyendo la Lisozima) en el sobrenadante es considerablemente superior utilizando el sistema desacoplado de crecimiento en comparación con un sistema estándar. Adicionalmente, se mejora la solubilidad de GFP utilizando el sistema desacoplado de crecimiento en comparación con un sistema estándar.

Figura 9: Esquema del proceso de referencia. Inducción con IPTG 0,1 mM.

Figura 10: Esquema del proceso de cultivos de lote alimentado y estrategia de inducción con Arabinosa e IPTG.

Figura 11: Análisis SDS page de cultivos en matraz agitado de BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa) y BL21(DE3)pET30(HIV1-proteasa).

Comparación de muestras inducidas y no inducidas de cultivos de la cepa de referencia y de la cepa modelo. Las bandas de HIV1-proteasa se localiza en 11 kDa.

Figura 12: Crecimiento y cinética de formación de producto de las cepas BL21(DE3)pET30a(HIV1-proteasa) y BL21(DE3):TN7<GP2ΔAra>pET30a(HIV1-proteasa).

(A) Proceso de fermentación de referencia: Inducción con 20 μmol IPTG/g de CDM a las 21 h de alimentación con tasa de alimentación exponencial de $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$; (B) Proceso de fermentación modelo: Inducción con arabinosa 0,1 M + 20 μmol IPTG/g a las 11 h de alimentación, cuando la alimentación exponencial ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$) se cambió a alimentación lineal;

Figura 13: Análisis SDS page del proceso de fermentación de referencia con BL21(DE3)pET30(HIV1-proteasa).

Figura 14: Análisis SDS PAGE: Cultivo de BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa).

Figura 15: Comparación de rendimientos de producción de HIV1-proteasa por BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa) [proceso modelo, verde] y BL21(DE3)pET30a(HIV1-proteasa) [proceso de referencia, rojo].

(A, C, E) Comparación de HIV1-proteasa producida total, soluble e insoluble; (B, D) Comparación de CDM total y CDM neta; (F) HIV1-proteasa total producida mediante ambos sistemas.

Figura 16: Perfil de alimentación establecido para la expresión de proteínas desacoplada del crecimiento en cultivo de lote alimentado en biorreactor HCD.

Tendencias teóricas de la curva de crecimiento y la tasa de crecimiento, cálculo basado en un coeficiente de rendimiento de glucosa constante durante el cultivo.

Figura 17: Análisis SDS page de cultivo HCD de BL21 (DE3): :TN7(Gp2ΔAra)pET30(GFPmut3.1).

Inducido con 20 μmol IPTG/g de CDM y arabinosa 0,1 M a la hora 15 de alimentación, cuando la alimentación exponencial ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$) se cambió a alimentación lineal. La banda de GFP se localiza en 27 kDa.

Figura 18: Crecimiento y cinética de formación de producto del cultivo HCD de la cepa BL21(DE3):TN7<GP2ΔAra>pET30a(GFPmut3.1).

Inducción con arabinosa 0,1 M + 20 μmol IPTG/g a las 15 h, cuando la alimentación exp. ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$) se cambió a alimentación lineal.

Figura 19: Consumo por hora (A) y total (B) de O₂ y formación de CO₂ durante el cultivo HCD del sistema desacoplado de crecimiento.

Inducción con arabinosa 0,1 M + 20 μmol IPTG/g CDM a las 15 h con tasa de alimentación exponencial de $\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$; Medio de alimentación suplementado con (NH₄)₂SO₄.

Figura 20: Comparación de rendimientos de la producción de GFPmut3.1 entre cultivos HCD y no HCD de BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(GFPmut3.1).

(A, C, E) Comparación de GFPmut3.1 producido total, soluble e insoluble; (B, D) Comparación de CDM total y CDM neta; (F) Total de GFPmut3.1 producido.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, pero no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: La inhibición de la ARN polimerasa de células hospedadoras inhibe el crecimiento de la célula hospedadora.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la ARN polimerasa de células hospedadoras sobre la proliferación de la célula hospedadora, la secuencia que codifica Gp2 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa se clonó en el plásmido f de copia baja pKLJ12 (Jones y Keasling (1998) Biotechnol Bioeng Vol. 59, Fascículo 6: 659-665), que constituye solo una carga pequeña para la célula hospedadora y se mantiene establemente. Se sabe que la proteína Gp2 inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora mediante la unión a la subunidad beta de la enzima. El plásmido pKLJ12+Gp2 se transformó en la cepa de *E.coli* NEB10-beta que comprende una mutación araD139. En consecuencia, NEB10-beta no es capaz de metabolizar el inductor arabinosa. En el punto temporal 0h, se inocularon varios cultivos y se indujo la expresión de Gp2 tras 2h mediante la adición de arabinosa 1,5 %, 0,1 % o 0,001 %. La proliferación de las bacterias se midió determinando el valor de DO600nm. La adición de diferentes concentraciones de arabinosa y de este modo la expresión de Gp2 causaron la inhibición de la proliferación de una forma dependiente de la dosis, en comparación con un cultivo de bacterias en el que se omitió la arabinosa (Fig. 1). Con el fin de excluir cualquier efecto del compuesto arabinosa sobre el crecimiento de células hospedadoras se ha empleado un derivado del plásmido pKLJ12+Gp2 al que le falta el sitio de unión al ribosoma del casete de expresión Gp2. En consecuencia, la expresión de Gp2 no se puede inducir y por lo tanto no se observó diferencia en la proliferación con o sin arabinosa (Fig. 2).

Ejemplo 2: Integración del casete de expresión que codifica Gp2 en el genoma de las células hospedadoras.

Con el fin de conferir una expresión estable de la proteína Gp2 en la población de células hospedadoras, se integró el casete de expresión que codifica Gp2 en el genoma de NEB10-beta a través de la recombinación homóloga en el locus TN7. La secuencia insertada comprendió el gen Gp2 bajo el control de un promotor de arabinosa, un regulador, un terminador y un gen de resistencia a ampicilina. Con este fin, se añadió un saliente de 50 pb al elemento de inserción a través de una PCR. El producto de la PCR lineal se transformó de forma simultánea en la célula hospedadora NEB10-beta con un plásmido auxiliar pSIM, que confiere expresión de proteínas inducida por choque térmico que media la integración del producto de la PCR en el genoma de las células hospedadoras. Tras la integración con éxito, el plásmido pSIM se puede retirar de la célula hospedadora (Sharan et al., 2009, Nat Protoc. 4(2):206-23).

Ejemplo 3: La expresión inducida de Gp2 en *E.coli* incrementa el nivel de expresión de la proteína modelo GFP.

La cepa de *E.coli* HMS174(DE3) TN7::<T7GFP>, que comprende la secuencia codificante de GFP bajo el control de un promotor de T7 y una ARN polimerasa de T7 bajo el control de un promotor inducible de IPTG, se transformó con el plásmido pKLJ12+Gp2 que alberga la secuencia que codifica Gp2 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Aproximadamente 2 h después de la inoculación del cultivo, se añadió IPTG para inducir la expresión de la ARN polimerasa de T7 y de este modo, de GFP. Aproximadamente 3 h después de la inoculación, se añadió arabinosa para expresar Gp2. Tres experimentos consecutivos mostraron que las células hospedadoras inducidas con IPTG y arabinosa, que expresan ARN polimerasa de T7 y Gp2, expresaron GFP en mayor medida en comparación con las células hospedadoras que se indujeron con IPTG, únicamente y por tanto expresaron ARN polimerasa de T7 pero no Gp2. En las dos muestras que carecen de IPTG con o sin arabinosa, se expresó GFP ligeramente debido a la permeabilidad del promotor (Fig. 3).

Ejemplo 4: La expresión de Gp2 del inserto pKLJ12+Gp2 sin el vector incrementa la expresión de GFP.

La cepa de *E.coli* HMS174(DE3) TN7::<T7GFP>, que comprende la secuencia codificante de GFP bajo el control de un promotor de T7 y una ARN polimerasa de T7 bajo el control de un promotor inducible de IPTG, se transformó con el inserto de pKLJ12+Gp2 que comprende el casete de expresión Gp2. En dos de tres casos, la transformación del casete de expresión Gp2 dio como resultado una expresión de GFP incrementada 3 h después de la inducción de IPTG (Fig. 4).

Ejemplo 5: Descripción de un ejemplo de proceso de fermentación en el que se evaluó el efecto de la expresión de Gp2 sobre el rendimiento de la proteína modelo GFP.

Modo de cultivo y análisis del proceso

Las células se cultivaron en un biorreactor de 12 L (8 L volumen neto, 4 L volumen del lote) controlado por ordenador (MBR; Wetzikon, Suiza) equipado con unidades de control estándar. El pH se mantuvo en un punto predefinido de $7,0 \pm 0,05$ mediante la adición de solución de amoníaco al 25 % (ACROS Organics), la temperatura se estableció en $37 \pm 0,5$ °C. Con el fin de evitar la limitación de oxígeno, el nivel de oxígeno disuelto se estabilizó por encima del 30 % de saturación mediante el control de velocidad del agitador y de la tasa de aireación. Las mediciones de

fluorescencia se realizaron usando un espectrofluorómetro de longitud de onda múltiple diseñado para mediciones en línea en un entorno industrial, el BioView® (DELTA Light & Optics, Lyngby, Dinamarca). La espuma se eliminó mediante la adición de una suspensión antiespumante (PBG2000) con una concentración de 0,5 ml/l de medio. Para la inoculación, un vial de banco de células de trabajo congelado (-80 °C), se descongeló y se transfirió 1 ml (densidad óptica $DO_{600} = 1$) asépticamente al biorreactor. Se inició la alimentación cuando el cultivo, cultivado hasta una materia seca bacteriana de 22,5 g en un medio discontinuo de 4 L, entró en fase estacionaria. Con el inicio de la fase de alimentación, la temperatura de cultivo se reduce a 30 °C. El medio de alimentación proporcionó componentes suficientes para producir otros 363 g de materia seca bacteriana (4 duplicaciones).

En el proceso de referencia (Fig. 6) se utilizó el sistema de expresión (estándar) de *E. coli* BL21(DE3)pET30a GFPmut3.1. La tasa de crecimiento en la fase de alimentación se estableció en $0,1 \text{ h}^{-1}$ y 3 duplicaciones tras el inicio de la alimentación se realizó la inducción de la expresión génica recombinante con IPTG 20 μmol por gramo de CDM mediante un pulso único directamente al biorreactor.

En el proceso con el sistema de expresión (estándar) de *E. coli* BL21(DE3)pET30a GFPmut3.1 que contiene una proteína Gp2 inducible integrada en el genoma (Fig. 7), la tasa en la fase de crecimiento se estableció en $0,2 \text{ h}^{-1}$ para 3 duplicaciones a través de una alimentación de sustrato exponencial. Después se realizó la inducción con IPTG 20 μmol por gramo de masa seca celular y arabinosa 10 mmol y el medio alimentado se cambió a una alimentación lineal durante otras 16 h con una tasa de crecimiento inicial de $0,05 \text{ h}^{-1}$. La alimentación del sustrato se controla mediante el aumento de la velocidad de la bomba, según el algoritmo de crecimiento exponencial, $x = x_0 \cdot e^{\mu t}$, con control de pérdida de peso retroactivo superpuesto en el tanque del sustrato.

Composición de los medios

El medio mínimo utilizado en este estudio contiene 3 g de KH_2PO_4 y 6 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ por litro. Estas concentraciones proporcionan la capacidad tamponadora necesaria y sirven también como fuentes de P y K. Los otros componentes se añaden según los gramos de materia seca bacteriana a producir: 0,25 g de citrato sódico (sal trisódica $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ACROS organics), 0,10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 μl de solución de oligoelementos y 3 g de glucosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$. Para acelerar el crecimiento inicial de la población, se añadieron 0,15 g del componente complejo extracto de levadura al medio mínimo para obtener el medio discontinuo. Para la fase de alimentación se prepararon 8 L de medio mínimo según la cantidad de materia seca biológica de 363 g a producir en la fase de alimentación, por la que se añadieron de nuevo sales de P por litro. Solución de oligoelementos: preparada en HCl 5 N (g/l): 40,0 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10,0 de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10,0 de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4,0 de CoCl_2 (Fluka), 2,0 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,50 de H_3BO_3 .

Análisis sin conexión (en inglés, offline)

La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm. La materia seca bacteriana se determinó mediante la centrifugación de 10 ml de la suspensión celular, resuspensión en agua destilada seguida de centrifugación y resuspensión para transferir a un vaso de precipitados previamente pesado, que a continuación se secó a 105 °C durante 24 h y se volvió a pesar. El progreso del crecimiento bacteriano se determinó mediante el cálculo de la cantidad total de masa seca celular (CDM total).

El contenido de la proteína recombinante GFP se determinó mediante ELISA y la cuantificación de proteína electroforética utilizando una cuantificación densitométrica de bandas sobre un gel SDS-PAGE. El producto recombinante soluble se cuantificó a través de ELISA de GFP, mientras que el producto recombinante en los cuerpos de inclusión se determinó con electroforesis en gel SDS-PAGE.

Adicionalmente, se analizaron el sobrenadante y los cuerpos de inclusión utilizando electroforesis en gel SDS-PAGE. El gel SDS PAGE teñido con coomassie muestra un incremento de GFP soluble en el sobrenadante utilizando el sistema desacoplado de crecimiento en comparación con un sistema estándar. Asimismo, la cantidad relativa de GFP respecto a HCP en el sobrenadante es considerablemente superior utilizando el sistema desacoplado de crecimiento en comparación con un sistema estándar. Adicionalmente, se mejora la solubilidad de GFP utilizando el sistema desacoplado de crecimiento en comparación con un sistema estándar (BL21(DE3)pET30a GFPmut3.1) que no está desacoplado del crecimiento (Fig. 8).

Ejemplo 6: Producción de HIV-1 proteasa utilizando el sistema desacoplado de crecimiento.

Para demostrar la aplicabilidad del proceso desacoplado de crecimiento desarrollado, se requirieron proteínas recombinantes alternativas. Para ese propósito, se seleccionó la proteasa HIV-1 como segunda proteína modelo para la verificación del sistema desacoplado de crecimiento y el proceso modelo, dado que es difícil de producir porque es altamente tóxica para *E. coli* (Korantand Rizzo, (1991), Biomed Biochim Acta 50: 643-6). La sobreexpresión de esta aspártico proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en *E. coli* se suele acompañar de efectos tóxicos sobre las células productoras (Fernandez et al., (2007), Biotechnol Lett 29: 1381-6), ligados posiblemente a su actividad proteolítica. En consecuencia, habitualmente esta proteína es difícil de expresar en sistemas microbianos. Las proteínas retrovirales se sintetizan como precursores de poliproteínas y se procesan por proteínas específicas (Volontè et al., (2011), Microb Cell Fact 10: 53). Estos precursores son los polipéptidos

Gag y Gag-Pol, que se procesan proteolíticamente por la HIV-1 proteasa para madurar las proteínas (Kohl et al., (1988), Proc Natl Acad Sci U S A 85: 4686-90).

Las HIV-1 proteasas se codifican por virus VIH (en inglés, HIV) y por tanto juegan un papel importante en la maduración del virus. Es una diana interesante para desarrollar un posible tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA; en inglés, AIDS). El objetivo último es la disponibilidad de un sistema que pueda expresar grandes cantidades de HIV-1 proteasa en sistemas de cultivo bacteriano, para obtener grandes cantidades de esta proteína. (Volontè et al., (2011), Microb Cell Fact 10: 53)

Proceso de fermentación de referencia:

La fase discontinua del cultivo se realizó a una temperatura de 37 °C y se inoculó con 1 ml del banco de células de trabajo (WCB; del inglés, working cell bank). Dependiendo del experimento, las siguientes cepas, que contienen dos proteínas modelo diferentes, se utilizaron para este esquema de proceso:

- BL21 (DE3)pET30(GFPmut3.1)
- BL21(DE3)pET30(HIV1-proteasa)

La fase discontinua se completó después de 11 h a 13 h (indicado por un pico en el oxígeno disuelto) y la fase de alimentación se inició inmediatamente después. En la fase de alimentación exponencial la temperatura descendió a 30 °C con el fin de reducir la formación de cuerpos de inclusión de la proteína recombinante expresada, así como para conseguir mejor solubilidad de O₂. La tasa de crecimiento (μ) del proceso de alimentación en lotes se mantuvo constante en 0.10 h⁻¹ mediante una alimentación de sustrato exponencial durante 4 generaciones. La alimentación se inició después de que la masa seca celular (CDM) alcanzó el final de la fase discontinua con 22,5 g de CDM en 4 L de volumen del lote.

La inducción con un pulso único de IPTG (20 μ mol/g de CDM) tuvo lugar tras la 3ª generación (21 h después de iniciar la alimentación) en la fase de alimentación. El procedimiento de muestreo se prolongó durante 1 generación. En la Figura 9 se muestra un resumen del esquema del proceso de referencia.

Proceso de fermentación / sistema de producción desacoplado de crecimiento:

La fase discontinua del cultivo se realizó a una temperatura constante de 37 °C y se inoculó con 1 ml del WCB. Los siguientes sistemas se cultivaron con este esquema de proceso:

- BL21 (DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(GFPmut3.1)
- BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(HIV1-proteasa)

La fase discontinua se completó después de 11 h a 13 h y la fase de alimentación se inició inmediatamente después. En la fase de alimentación exponencial la temperatura descendió a 30 °C con el fin de alcanzar una mejor solubilidad de la proteína recombinante expresada y para alcanzar una tasa de transferencia de oxígeno (OTR; del inglés, oxygen transfer rate) mejor. La tasa de crecimiento se mantuvo constante a $\mu = 0.20$ h⁻¹. La producción de proteína recombinante se indujo con un pulso único de arabinosa 0,1 M (Gp2) y 20 μ mol IPTG/g CDM (gen de interés - GOI) tras la 3ª generación (21 h después del inicio de la alimentación). El muestreo tuvo lugar durante la 4ª generación, se aplicó un perfil de alimentación lineal empezando con una tasa de crecimiento inicial de $\mu = 0,050$ h⁻¹ que decreció a $\mu = 0,025$ h⁻¹ en el curso del experimento. El procedimiento de muestreo se prolongó durante 1 generación. En la figura 10 se muestra un resumen del esquema del proceso de referencia.

Producción de HIV-1 proteasa en Escherichia coli:

Con el fin de probar la aplicabilidad amplia del proceso de plataforma, se requieren experimentos con proteínas recombinantes alternativas. Para ese propósito, la HIV-1 proteasa, una proteína difícil de producir en *E. coli*, se seleccionó para experimentos de referencia.

Antes de que se llevaran a cabo los cultivos en biorreactor de la cepa de referencia BL21(DE3)pET30a(HIV1-proteasa) y la cepa modelo BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(HIV1-proteasa), se realizaron cultivos en matraz agitado estándar para verificar si se produjo proteína recombinante. La banda de HIV1-proteasa se localiza en 11 kDa bajo la banda de lisozima. Se utilizó la siguiente ecuación lineal para la cuantificación de la HIV1-proteasa:

$$y = 0,0007x \quad R^2 = 0,9708$$

Según la Figura 11, ambas cadenas fueron capaces de producir HIV1-proteasa en forma soluble. La producción del sistema desacoplado de crecimiento produjo una concentración de 69 μ g/ml, mientras que el sistema de referencia

produjo solo 5 µg/ml de HIV1-proteasa insoluble. En consecuencia, la BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa) fue capaz de producir 13 veces más HIV1-proteasa que la cepa de referencia.

Como ambas cadenas fueron capaces de producir la proteína modelo, se realizaron cultivos a escala de laboratorio de ambos sistemas. La BL21(DE3)pET30a(HIV1-proteasa) se utilizó como sistema de referencia y se realizó el proceso de fermentación según la descripción anterior. En paralelo, el proceso de plataforma nuevo con el sistema desacoplado de crecimiento se realizó como se describe en la Figura 10 con la BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa). Se aplicó una tasa de crecimiento de $\mu = 0.20 \text{ h}^{-1}$ durante la fase de alimentación exponencial.

Como se muestra en el gráfico de la Figura 12, la concentración específica máxima de HIV-1 proteasa para el proceso estándar fue de 11,8 mg/g de CDM sin expresión soluble de la proteína. El rendimiento volumétrico obtenido con 0,3 g/l es también muy bajo. Este resultado confirma la afirmación de que la HIV-1 proteasa pertenece al grupo de las proteínas de bajo rendimiento y de difícil expresión (Volontè et al., (2011), Microb Cell Fact 10: 53; Wörsdörfer et al., (2011), Science 331: 589-92). El gráfico B muestra que en el proceso modelo, el crecimiento de CDM se detuvo después de la inducción y no hubo descenso en la CDM neta. Al final del proceso, el sistema desacoplado de crecimiento produjo 233,5 g de CDM en total. En comparación con el proceso de referencia, que produjo 331,92 g de CDM, el proceso modelo generó un 30 % de CDM. Tras la inducción de la producción de proteínas, el proceso modelo también consumió 155,2 g menos base en comparación con el sistema de referencia. La Figura 13 muestra el análisis SDS page del proceso de referencia. Se utilizó la siguiente ecuación lineal para la cuantificación de la fermentación del proceso de referencia:

$$y = 0,0006x \quad R^2 = 0,9981$$

Según la Figura 13, el sistema de referencia fue capaz únicamente de producir HIV1-proteasa en forma insoluble (IB). Al comienzo de la fase de expresión de la proteína, la BL21(DE3)pET30(HIV1-proteasa) produjo 2 µg de HIV1-proteasa insoluble por ml. Al final de la 4ª generación el proceso de referencia produjo 19 µg de HIV1-proteasa insoluble por ml.

La Figura 14 muestra el análisis SDS page del proceso de fermentación desacoplado del crecimiento. Se utilizó la siguiente ecuación lineal para la cuantificación de la HIV1-proteasa:

$$y = 0,0009x \quad R^2 = 0,9611$$

Según la figura 14, el sistema desacoplado de crecimiento fue capaz de producir HIV1-proteasa en forma soluble (S) e insoluble (IB). Al comienzo de la fase de producción de proteínas la BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa) expresó el 79 % de HIV1-proteasa soluble y el 21 % de insoluble. La proporción de proteína soluble decreció con la duración del proceso prolongada. Al final de la 4ª generación (27 h tras el inicio de la alimentación) se expresó el 12 % como HIV1-proteasa soluble y el 88 % como insoluble.

En la Figura 15 se muestra un resumen de los resultados de estos experimentos. Como se muestra en el gráfico A, el sistema desacoplado de crecimiento fue capaz de producir HIV1-proteasa con una concentración de 47 mg/g de CDM, mientras que el proceso de referencia produjo una concentración total de HIV1-proteasa de 12 mg/g de CDM. Por tanto, BL21(DE3)::TN7(Gp2ΔAra)pET30(HIV1-proteasa) produjo casi cuatro veces más HIV1-proteasa por gramo de CDM en comparación con BL21(DE3)pET30a(HIV1-proteasa). Según el gráfico C, el proceso modelo produjo una concentración de 9 mg/g de HIV1-proteasa soluble al final del proceso, mientras que la cepa de referencia no fue capaz de producir HIV1-proteasa en forma soluble. Como se observa en el gráfico F, el proceso modelo produjo una masa total de 11 g de HIV1-proteasa, mientras que el proceso de referencia solo alcanzó una producción total de 4 g. En conclusión, el proceso modelo produjo alrededor de tres veces más HIV1-proteasa en comparación con el proceso de referencia. El gráfico D de la Figura 15 muestra la CDM neta calculada sin producto recombinante producido (X-P) en gramos. X-P permaneció constante en comparación con la producción total de CDM (gráfico B). Tras la inducción del sistema desacoplado de crecimiento, se crearon 26 g de CDM hasta el final del proceso, mientras que el sistema de referencia produjo 122 g de CDM durante la fase de producción. En resumen, el sistema desacoplado de crecimiento produjo un 282 % más de HIV1-proteasa con aproximadamente un 30 % de CDM menos, en comparación con el sistema de referencia.

Ejemplo 7: Cultivos de alta densidad celular (HCDC; del inglés, high-cell-density cultivations) utilizando el sistema desacoplado de crecimiento.

Los resultados de los cultivos en biorreactor no HCD indicaron que el sistema de expresión desacoplado del crecimiento debe permitir tasas de crecimiento variables antes de la inducción, lo que es importante para cultivos HCD dado que una tasa de crecimiento de $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ es difícil de mantener sin riesgo de la limitación de oxígeno. En condiciones subóptimas, se produciría una tasa de crecimiento demasiado elevada, especialmente durante la fase

de alimentación exponencial. El proceso HCD se planificó para alcanzar una concentración de CDM de 60 g/l en el punto temporal de la inducción. Dado que la HCDC realizada solo debería mostrar la capacidad del sistema desacoplado de crecimiento para alcanzar cantidades específicas de proteína comparables y una mayor productividad en un semi-HCDC en comparación con un no-HCDC, se utilizó GFPmut3.1 como proteína modelo. El plan de fermentación HCD se muestra en la Figura 16. El lote se realizó a una temperatura de 37 °C y se completó tras 16 h. Una fase de alimentación exponencial ($\mu = 0.17 \text{ h}^{-1}$) se inició inmediatamente después de que finalizara la fase discontinua, que se prologó aproximadamente 2 generaciones. El medio de alimentación se suplementó también con sulfato amónico para garantizar las condiciones no limitantes de nitrógeno. Después, se aplicó el primer perfil de alimentación lineal, que se prolongó 1 generación. 15 h después del inicio de la fase de alimentación la producción de proteínas se indujo con arabinosa 0,1 M + 20 $\mu\text{mol IPTG/g}$ de CDM. Durante la fase de producción se aplicó un segundo perfil de alimentación lineal, que se prolongó aproximadamente 1 generación con una tasa de crecimiento calculada decreciente comenzando en $\mu = 0,050 \text{ h}^{-1}$ al inicio hasta un μ de $0,020 \text{ h}^{-1}$ al final del proceso. La fase de expresión de la proteína se prolongó 33 h. El propósito de la tasa de crecimiento baja fue suministrar justo la glucosa suficiente para la cepa, ya que necesita expresar la POI.

La Figura 17 muestra el análisis SDS page del cultivo HCD del sistema desacoplado de crecimiento. Tras 33 h de producción de proteínas, BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(GFPmut3.1) fue capaz de producir el 63 % de GFP soluble y el 37 % de insoluble, que es una mejora en comparación con el cultivo no HCD del proceso de sistema desacoplado de crecimiento y muestra que la escalada a HCDC no tiene un impacto significativo sobre la solubilidad de la proteína expresada.

La Figura 18 muestra los resultados del HCDC del sistema desacoplado de crecimiento. BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(GFPmut3.1) fue capaz de producir 268,4 mg GFP soluble y 157,6 mg de insoluble por g de CDM. Durante la fase de producción se produjo una cantidad total de 279,5 g de GFP y 176,1 g de esta en forma soluble. El proceso produjo una concentración de 30 g/l de GFP, que es un incremento del 300 % en comparación con el no HCDC del sistema desacoplado de crecimiento. Tras la inducción de la expresión de la proteína, la CDM se detuvo y permaneció más o menos constante, lo que concuerda con los resultados del sistema desacoplado de crecimiento no HCDC.

El análisis del consumo total de O_2 y la formación total de CO_2 durante la producción de proteínas del proceso de fermentación del modelo HCD, mostró que el sistema desacoplado de crecimiento forma una cantidad total de CO_2 elevada comparable con el sistema desacoplado de crecimiento no HCDC. Como se observa en el gráfico A de la Figura 19, tras la inducción de la producción de proteínas, el consumo de O_2 y la formación de CO_2 de BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(GFPmut3.1) permanecieron constantes, lo que muestra que el proceso HCD es activo todavía metabólicamente.

La Figura 20 muestra un resumen de los resultados del cultivo del sistema desacoplado de crecimiento HCD y no HCD. El gráfico A muestra que el no HCDC de BL21(DE3)::TN7(Gp2 Δ Ara)pET30(GFPmut3.1) fue capaz de producir 480,18 mg de GFP por g de CDM, que es la concentración específica más elevada de todos los cultivos realizados. El proceso HCD alcanzó una concentración específica elevada comparable con 426 mg de GFP por g de CDM. Asimismo, el proceso HCDC fue capaz de producir un 7 % más de GFP específica en forma soluble. Como se observa en el gráfico D, durante ambos cultivos el crecimiento de la CDM se detuvo y decreció tras la inducción de la expresión de proteínas. En el momento de la inducción, el proceso HCDC alcanzó una concentración de CDM de 57 g/l y generó un 216 % más de CDM bruta en comparación con el proceso no HCDC, que alcanzó los 22 g/l en el momento de la inducción (gráfico B). El HCDC del sistema desacoplado de crecimiento produjo una cantidad total de 280 g de GFP, que es un incremento del 243 % en comparación con el no HCDC del sistema (gráfico F). Considerando la CDM total producida, mostrada en el gráfico B y la CDM neta producida, mostrado en el gráfico F, el HCDC produjo un 243 % más GFP con un 300 % más de CDM neta en comparación con el no HCDC. El gráfico D muestra la CDM neta calculada sin proteína recombinante producida (X-P) en g. El descenso de CDM neta probó que tras la inducción de ambos sistemas se produjo GFPmut3.1 recombinante casi exclusivamente.

La comparación de la GFP producida total y la CDM neta producida entre el proceso no HCD y el proceso HCD, muestra que el sistema desacoplado de crecimiento muestra una relación lineal entre la GFP producida y la CDM neta, incluso en el proceso HCD ampliado. Esto también revela que el cultivo HCD del sistema desacoplado de crecimiento tiene elevado potencial para la fermentación HCDC adicional con concentraciones de CDM mucho más elevadas. El cultivo con una concentración de CDM de hasta 100 g/l antes de la inducción debe producir una cantidad enorme de GFP.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitaet fuer Bodenkultur Wien

<120> Desvinculación de crecimiento y producción de proteínas

<130> BOK15287PCT

<150> LU92705
<151> 30/04/2015

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 64
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Proteína Gp2 de fago

<400> 1

Met Ser Asn Val Asn Thr Gly Ser Leu Ser Val Asp Asn Lys Lys Phe
1 5 10 15

Trp Ala Thr Val Glu Ser Ser Glu His Ser Phe Glu Val Pro Ile Tyr
20 25 30

Ala Glu Thr Leu Asp Glu Ala Leu Glu Leu Ala Glu Trp Gln Tyr Val
35 40 45

Pro Ala Gly Phe Glu Val Thr Arg Val Arg Pro Cys Val Ala Pro Lys
50 55 60

<210> 2
<211> 110
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Proteína Nun de fago

<400> 2

Met Val Lys Lys Thr Ile Tyr Val Asn Pro Asp Ser Gly Gln Asn Arg
1 5 10 15

Lys Val Ser Asp Arg Gly Leu Thr Ser Arg Asp Arg Arg Ile Ala
20 25 30

Arg Trp Glu Lys Arg Ile Ala Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Val Thr Pro
35 40 45

ES 2 806 985 T3

Gly Phe Asn Ala Ile Asp Asp Gly Pro Glu Tyr Lys Ile Asn Glu Asp
50 55 60

Pro Met Asp Lys Val Asp Lys Ala Leu Ala Thr Pro Phe Pro Arg Asp
65 70 75 80

Val Glu Lys Ile Glu Asp Glu Lys Tyr Glu Asp Val Met His Arg Val
85 90 95

Val Asn His Ala His Gln Arg Asn Pro Asn Lys Lys Trp Ser
100 105 110

<210> 3

<211> 883

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Proteina Gp0.7 de fago

<400> 3

ES 2 806 985 T3

Met	Asn	Thr	Ile	Asn	Ile	Ala	Lys	Asn	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ile	Pro	Phe	Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Leu
			20					25					30		
Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Met	Gly	Glu
		35					40					45			
Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Met	Phe	Glu	Arg	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Val
	50					55					60				
Ala	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Leu	Pro	Lys
65					70					75					80
Met	Ile	Ala	Arg	Ile	Asn	Asp	Trp	Phe	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Arg
				85					90					95	
Gly	Lys	Arg	Pro	Thr	Ala	Phe	Gln	Phe	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Pro	Glu
			100					105					110		
Ala	Val	Ala	Tyr	Ile	Thr	Ile	Lys	Thr	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser
		115					120					125			
Ala	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Arg	Ala
	130					135					140				
Ile	Glu	Asp	Glu	Ala	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	Arg	Asp	Leu	Glu	Ala	Lys

ES 2 806 985 T3

145		150		155		160
His	Phe	Lys	Lys	Asn	Val	His
				165		175
Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Val
				180		190
Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu
		195				200
Ser	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg
	210					215
Gly	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg
225					230	
Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala
				245		255
Arg	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly
			260			265
Val	Pro	Pro	Lys	Pro	Trp	Thr
			275			280
Asn	Gly	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala
	290					295
Leu	Met	Arg	Tyr	Glu	Asp	Val
305					310	
Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala
				325		330
Val	Ala	Asn	Val	Ile	Thr	Lys
			340			345
Pro	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Glu
			355			360
Met	Asn	Pro	Glu	Ala	Leu	Thr
	370					375
Tyr	Arg	Lys	Asp	Lys	Ala	Arg
385					390	

ES 2 806 985 T3

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly
610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
645 650 655

ES 2 806 985 T3

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720
 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780
 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845
 Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala

<210> 4
 <211> 52
 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Proteína Gp6 de fago

5

<400> 4

Met Arg Lys Ser Leu Ile Met Gly Thr Lys Glu Asp Val Ala Lys Met
1 5 10 15

Lys Ala Lys Arg Gln Met Asn Lys Ala Val Thr Phe Ala Glu Arg Tyr
20 25 30

Ser Thr Ser Glu Pro Val Arg Arg Ile Val Thr Phe Asn His Pro Ala
35 40 45

Ile Lys Gly Met
50

10

<210> 5

<211> 71

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Proteína Gp8 de fago

<400> 5

Met Glu Gln Leu Asn Tyr Gly Tyr Lys Ile Lys Arg Asn Gln Val Arg
1 5 10 15

Gly Ser Trp Leu Phe Leu Val Tyr Gly Lys Pro Ile Tyr Glu Leu His
20 25 30

Arg Gly Glu Lys Ser Lys Thr Tyr Tyr Val Thr His Ile Ala Thr Gly
35 40 45

Lys Thr Pro Ala Cys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Ala Ile Met Lys Ala
50 55 60

Cys Met Leu Glu Gly Leu Leu
65 70

20

<210> 6

<211> 341

<212> PRT

25

<213> artificial

<220>

<223> Proteína A* de fago

ES 2 806 985 T3

<400> 6

```

Met Lys Ser Arg Arg Gly Phe Ala Ile Gln Arg Leu Met Asn Ala Met
1      5      10      15

Arg Gln Ala His Ala Asp Gly Trp Phe Ile Val Phe Asp Thr Leu Thr
      20      25      30

Leu Ala Asp Asp Arg Leu Glu Ala Phe Tyr Asp Asn Pro Asn Ala Leu
      35      40      45

Arg Asp Tyr Phe Arg Asp Ile Gly Arg Met Val Leu Ala Ala Glu Gly
50      55      60

Arg Lys Ala Asn Asp Ser His Ala Asp Cys Tyr Gln Tyr Phe Cys Val
65      70      75      80

Pro Glu Tyr Gly Thr Ala Asn Gly Arg Leu His Phe His Ala Val His
      85      90      95

Phe Met Arg Thr Leu Pro Thr Gly Ser Val Asp Pro Asn Phe Gly Arg
      100      105      110

Arg Val Arg Asn Arg Arg Gln Leu Asn Ser Leu Gln Asn Thr Trp Pro
      115      120      125

Tyr Gly Tyr Ser Met Pro Ile Ala Val Arg Tyr Thr Gln Asp Ala Phe
130      135      140

Ser Arg Ser Gly Trp Leu Trp Pro Val Asp Ala Lys Gly Glu Pro Leu
145      150      155      160

Lys Ala Thr Ser Tyr Met Ala Val Gly Phe Tyr Val Ala Lys Tyr Val
      165      170      175

Asn Lys Lys Ser Asp Met Asp Leu Ala Ala Lys Gly Leu Gly Ala Lys
      180      185      190

Glu Trp Asn Asn Ser Leu Lys Thr Lys Leu Ser Leu Leu Pro Lys Lys
      195      200      205

Leu Phe Arg Ile Arg Met Ser Arg Asn Phe Gly Met Lys Met Leu Thr
210      215      220

Met Thr Asn Leu Ser Thr Glu Cys Leu Ile Gln Leu Thr Lys Leu Gly
225      230      235      240

Tyr Asp Ala Thr Pro Phe Asn Gln Ile Leu Lys Gln Asn Ala Lys Arg
      245      250      255

```

ES 2 806 985 T3

Glu Met Arg Leu Arg Leu Gly Lys Val Thr Val Ala Asp Val Leu Ala
260 265 270

Ala Gln Pro Val Thr Thr Asn Leu Leu Lys Phe Met Arg Ala Ser Ile
275 280 285

Lys Met Ile Gly Val Ser Asn Leu Gln Ser Phe Ile Ala Ser Met Thr
290 295 300

Gln Lys Leu Thr Leu Ser Asp Ile Ser Asp Glu Ser Lys Asn Tyr Leu
305 310 315 320

Asp Lys Ala Gly Ile Thr Thr Ala Cys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Trp
325 330 335

Thr Ala Gly Gly Lys
340

<210> 7
<211> 69
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> YkzG (subunidad Epsilon) de Bacillus subtilis
<400> 7

Met Ile Tyr Lys Val Phe Tyr Gln Glu Lys Ala Asp Glu Val Pro Val
1 5 10 15

Arg Glu Lys Thr Asp Ser Leu Tyr Ile Glu Gly Val Ser Glu Arg Asp
20 25 30

Val Arg Thr Lys Leu Lys Glu Lys Lys Phe Asn Ile Glu Phe Ile Thr
35 40 45

Pro Val Asp Gly Ala Phe Leu Glu Tyr Glu Gln Gln Ser Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Val Leu Glu Leu
65

<210> 8
<211> 350
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> GP40 del fago SPO1 de Bacillus

ES 2 806 985 T3

<400> 8

```

Met His Ile Tyr Thr Tyr Trp Gly Leu Lys Tyr Val Pro Ser Asn Ser
1           5           10           15

Thr Met Val Ala Lys Glu Gly Asp Leu Ile Leu Leu Gly Asn Glu Val
20           25           30

His Lys Val Val Lys Val Leu His Arg Phe Arg Asn Ile Thr Asp Leu
35           40           45

Gln Ile Thr Asn Trp Lys Gly Thr Glu Thr Arg Tyr Asn Leu His Val
50           55           60

Thr Glu Tyr Lys Val Leu Val Pro Tyr Asp Thr His Lys Glu Glu Asn
65           70           75           80

Glu Ala Met Ser Asp Ser Leu Ile Thr His Asn Gly Lys Asp Tyr Val
85           90           95

Leu Cys Lys Ile Pro Ala Arg Val Gly Asp Leu Ile Arg Thr Glu Asp
100          105          110

Lys Arg Val Trp Glu Val Leu Gln Lys Ser Lys Asp Gly Leu Val Leu
115          120          125

Tyr Asn Glu Glu Lys Gly Glu Gln Arg Ser Ala Val Tyr Ser Glu Ile
130          135          140

Gly Pro Tyr His Val Leu Val Pro Arg Asp Thr Asp Thr His Thr Pro
145          150          155          160

Thr Arg Glu Glu Leu Ala Ala Val Ile Met Asn Lys Ala Phe Thr Arg
165          170          175

Thr Glu Thr Gln Asp Ser Gln Glu Asp Thr Gly Thr His Lys Gly Leu
180          185          190

Gly Leu Thr Gly Thr Asp Leu Tyr His Ser Leu Arg Asp Leu Asp Ala
195          200          205

Lys Val Gln Ser Gly Tyr Tyr Thr Ala Thr Glu Asn Glu Glu Asp Val
210          215          220

Lys Ser Glu Ile Glu Ala Thr Lys Lys His Met Lys Ala Val Lys Glu
225          230          235          240

```

ES 2 806 985 T3

Ser Gly Lys Thr Val Asn Asp Tyr Arg Lys Glu Glu Asn Thr Lys Arg
245 250 255

Cys Lys Leu Lys Ala Leu Thr Asn Lys Phe Asn Arg Leu Phe Leu Lys
260 265 270

Ser Val Ile Asp Thr Asp Ser Leu Gln Val Gly Lys Ala Tyr Leu Ile
275 280 285

Gly Gly Arg Asp Met Lys Asn Val His Gly Leu Tyr Thr Gly Thr Thr
290 295 300

Phe Asp Gln Gln His Ala Asn Phe Leu Ile Val Glu Thr Asp Arg Met
305 310 315 320

His Arg Thr Leu Thr Val Ser Ala Glu Gln Leu Phe Ala Glu Glu Arg
325 330 335

His Ile Val Asp Ile Glu Lys Arg Val Glu Gln Thr Glu Asp
340 345 350

<210> 9

<211> 202

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> GP67 del fago G1 de Staphylococcus

<400> 9

ES 2 806 985 T3

Met	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Phe	Glu	Arg	Lys	Ile	Ala	
1				5					10					15		
Lys	Glu	Leu	Thr	Ala	Trp	Trp	Gly	Tyr	Gln	Phe	Asn	Arg	Ser	Pro	Gln	
			20					25					30			
Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Trp	Gly	Lys	Asp	Asn	Asn	Ala	Val	Gly	Asp	Ile	
		35					40					45				
Val	Val	Pro	Gln	Glu	Ala	Asn	Phe	Pro	Leu	Val	Val	Glu	Cys	Lys	His	
	50					55					60					
Arg	Glu	Glu	Trp	Thr	Ile	Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Asn	Asn	Arg	Glu	Pro	
65					70					75					80	
His	Thr	Trp	Trp	Glu	Gln	Val	Ile	Asn	Asp	Ser	Ser	Lys	Val	Asn	Lys	
				85					90					95		
Thr	Pro	Cys	Leu	Ile	Phe	Thr	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Tyr	Val	Ala	
				100					105					110		
Leu	Pro	Tyr	Asp	Glu	Lys	Val	Tyr	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Asn	Glu	Tyr	
		115					120					125				
Pro	Val	Met	Arg	Thr	Asp	Phe	Ile	Ile	Asp	Asn	Ile	Arg	Lys	Asp	Lys	
	130					135					140					
Phe	Phe	Tyr	Asp	Val	Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Asn	Gly	Leu	Thr	Ser	Phe	
145					150					155					160	
Thr	Pro	Ser	Tyr	Ile	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asp	Lys	Lys	Asp	Ile	Lys	Pro	
				165					170					175		
Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Val	Ser	Lys	His	Glu	Asp	
			180					185					190			
Glu	Leu	Ile	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Asp	Ile							
		195					200									

<210> 10
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> GP39 del fago P23-45 de Thermus thermophilus

ES 2 806 985 T3

<400> 10

```

Met Val Glu Gly Phe Val Glu Pro Tyr Ile Arg Leu Phe Glu Ala Ile
1          5          10          15

Pro Asp Ala Glu Thr Glu Leu Ala Thr Phe Tyr Asp Ala Asp Leu Asp
          20          25          30

Thr Leu Pro Pro Arg Met Phe Leu Pro Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Pro
          35          40          45

Pro Gly Pro Val Arg Leu Glu Glu Ile Lys Arg Lys Arg Arg Val Arg
          50          55          60

Leu Val Lys Val Ser Ile Tyr Arg Phe Glu His Val Gly Leu Gly Leu
65          70          75          80

Ala Ala Arg Pro Tyr Ala Tyr Ala Tyr Ala Trp Gln Gly Asp Asn Gly
          85          90          95

Ile Leu His Leu Tyr His Ala Pro Val Val Leu Glu Asp Val Pro Glu
          100          105          110

Val Leu Glu Leu Asp Glu Val Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Val Arg Leu
          115          120          125

Met Arg Ala Met Gly His Val Asp Ala Phe Ile Asp Leu
          130          135          140

```

5 <210> 11
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> GP79 del fago PhiEco32 de enterobacterias

<400> 11

ES 2 806 985 T3

Met Asp Met Phe Ser Leu Glu Asp Leu Val Gln Asn Gly Met Met Glu
1 5 10 15

Gln Lys Glu Pro Leu Ile Val Gly Ser Arg Lys Glu Leu Arg Lys Leu
20 25 30

Cys Glu Glu Trp Gly Ile Thr Asn Gln Arg Met Ile Gly Asn Gln Phe
35 40 45

Ser Ala Ile Val Thr Phe Leu Lys Arg Gly Asp Lys Tyr Ser Met Glu
50 55 60

Cys Val Glu Arg Ile Ile Thr Glu Ala Gln Gln Asp Lys Gly Val Thr
65 70 75 80

Tyr Leu

5 <210> 12
<211> 73
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> P7 del bacteriófago Xp10 de Xanthomonas oryzae
<400> 12

Met Asn Glu Phe Thr Gln Ile Ser Gly Tyr Val Asn Ala Phe Gly Ser
1 5 10 15

Gln Arg Gly Ser Val Leu Thr Val Lys Val Glu Asn Asp Glu Gly Trp
20 25 30

Thr Leu Val Glu Glu Asp Phe Asp Arg Ala Asp Tyr Gly Ser Asp Pro
35 40 45

Glu Phe Val Ala Glu Val Ser Ser Tyr Leu Lys Arg Asn Gly Gly Ile
50 55 60

15 Lys Asp Leu Thr Lys Val Leu Thr Arg
65 70

20 <210> 13
<211> 167
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Alc del fago T4 de enterobacterias

ES 2 806 985 T3

<400> 13

Met Asp Leu Gln Leu Ile Thr Thr Glu Met Val Val Glu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Asp Gly Ile Ser Val Phe Lys Gly Asn Arg Arg Val Gly
20 25 30

Tyr Ile Thr Gly Leu Lys Lys Asp Leu Ala Lys Gln Val Lys Arg Lys
35 40 45

Thr Thr Ile Lys Glu Tyr Arg Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Arg Asp
50 55 60

Met Leu Pro Asp Ala Val Glu Glu Met Lys Val Phe Leu Glu Asn Gln
65 70 75 80

Leu Ala Lys Tyr Asp Cys Glu Val Phe Ile Asn Gln Thr Gln Pro Asn
85 90 95

Val His Ile Asn Ser Cys Lys Cys Tyr Ile Ile Val Asn Pro Leu Thr
100 105 110

Gly Lys His Arg Leu Gly Ile Ser Asn Pro Asn Arg Ser Ala Ser Asp
115 120 125

Met Ala Glu Asp Val Glu Ala Cys Phe Lys Ile Ser Lys Ser Pro Ala
130 135 140

Glu His His Ile Leu Ile Asn Gly Leu Ser Gln Asp Asp Ile Val Glu
145 150 155 160

Val Ile Lys Thr Leu Cys Met
165

5 <210> 14
<211> 90
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Asia del fago T4 de enterobacterias

<400> 14

ES 2 806 985 T3

Met Asn Lys Asn Ile Asp Thr Val Arg Glu Ile Ile Thr Val Ala Ser
1 5 10 15

Ile Leu Ile Lys Phe Ser Arg Glu Asp Ile Val Glu Asn Arg Ala Asn
20 25 30

Phe Ile Ala Phe Leu Asn Glu Ile Gly Val Thr His Glu Gly Arg Lys
35 40 45

Leu Asn Gln Asn Ser Phe Arg Lys Ile Val Ser Glu Leu Thr Gln Glu
50 55 60

Asp Lys Lys Thr Leu Ile Asp Glu Phe Asn Glu Gly Phe Glu Gly Val
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Leu Glu Met Tyr Thr Asn Lys
85 90

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora bacteriana que

- (i) comprende, bajo el control de un promotor inducible, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (iii) comprende bajo el control de un promotor reconocido por dicha ARN polimerasa una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

2. La célula hospedadora bacteriana de la reivindicación 1, en la que se inhibe el crecimiento mediante la inhibición de la transcripción, replicación de ADN y/o división celular.

3. La célula hospedadora bacteriana de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha proteína de fago es

(i) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(ii) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(iii) una proteína que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que fosforila la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(iv) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana;

(v) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o

(vi) una proteína que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma que inhibe la replicación del ADN de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 que inhibe la replicación del ADN de la célula

hospedadora bacteriana;

(vii) una proteína que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 o un fragmento de la misma que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y que inhibe la ARN polimerasa de la célula hospedadora bacteriana;

(viii) una proteína que provoca el apagado de la transcripción del hospedador, en la que dicha proteína es

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o un fragmento de las mismas que provoca el apagado de la transcripción del hospedador; o
- (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 40 % o más, tal como del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o del 90 % respecto a las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 y que provoca el apagado de la transcripción del hospedador.

4. La célula hospedadora bacteriana de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la ARN polimerasa está bajo el control de un promotor inducible o constitutivo.

5. La célula hospedadora bacteriana de la reivindicación 4, en la que la ARN polimerasa es la ARN polimerasa del bacteriófago T3, ARN polimerasa del bacteriófago T7, ARN polimerasa del T7 ortogonal modificado por ingeniería genética, ARN polimerasa del bacteriófago SP6 o ARN polimerasa del bacteriófago Xp10.

6. Una preparación de una célula hospedadora bacteriana que

- (i) comprende, bajo el control de un promotor inducible, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago como se ha definido en la reivindicación 3 que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana; y
- (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana.

7. Un método para la producción de una proteína de interés, que comprende cultivar la célula hospedadora bacteriana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones adecuadas y obtener dicha proteína de interés.

8. Un método para incrementar el rendimiento de una proteína de interés, que comprende cultivar una célula hospedadora bacteriana como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones adecuadas y obtener dicha proteína de interés.

9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, el que dicha etapa de cultivo incluye

- (a) crecimiento de las células bacterianas hasta una densidad de al menos 20 g/l de masa celular seca (CDM);
- (b) inducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fago que inhibe el crecimiento de la célula hospedadora;
- (c) alimentación de células bacterianas con una tasa de alimentación lineal constante que permitiría una tasa de crecimiento inicial de $0,05 \text{ h}^{-1}$; y
- (d) cultivo adicional de dichas células bacterianas durante al menos 12 horas.

10. Un método para incrementar el rendimiento de una proteína de interés, que comprende transformar un hospedador bacteriano que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una ARN polimerasa que es heteróloga para dicha célula hospedadora bacteriana y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, dicha secuencia de nucleótidos está bajo el control de un promotor que dicha ARN polimerasa reconoce, con una secuencia bajo el control de un promotor inducible, dicha secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de un fago que inhibe el crecimiento de dicha célula hospedadora bacteriana.

11. Un método para la producción de una proteína de interés, que comprende poner en contacto en condiciones adecuadas la preparación de la reivindicación 6 con una secuencia de nucleótidos que comprende, bajo el control de un promotor reconocido por una ARN polimerasa como se ha definido en la reivindicación 6 una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

12. Un método para la producción de un compuesto de interés, que comprende cultivar la célula hospedadora bacteriana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y añadir un compuesto que se convierte y/o se usa por dicha célula hospedadora bacteriana para la producción de dicho compuesto de interés.

13. El uso de la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la preparación de la reivindicación 6 para la producción de una proteína de interés.

5 14. El uso de la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la preparación de la reivindicación 6 para incrementar el rendimiento de una proteína de interés.

15. El uso de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fago como se define en la reivindicación 3 para incrementar el rendimiento de una proteína de interés en una célula hospedadora.

Figura 1

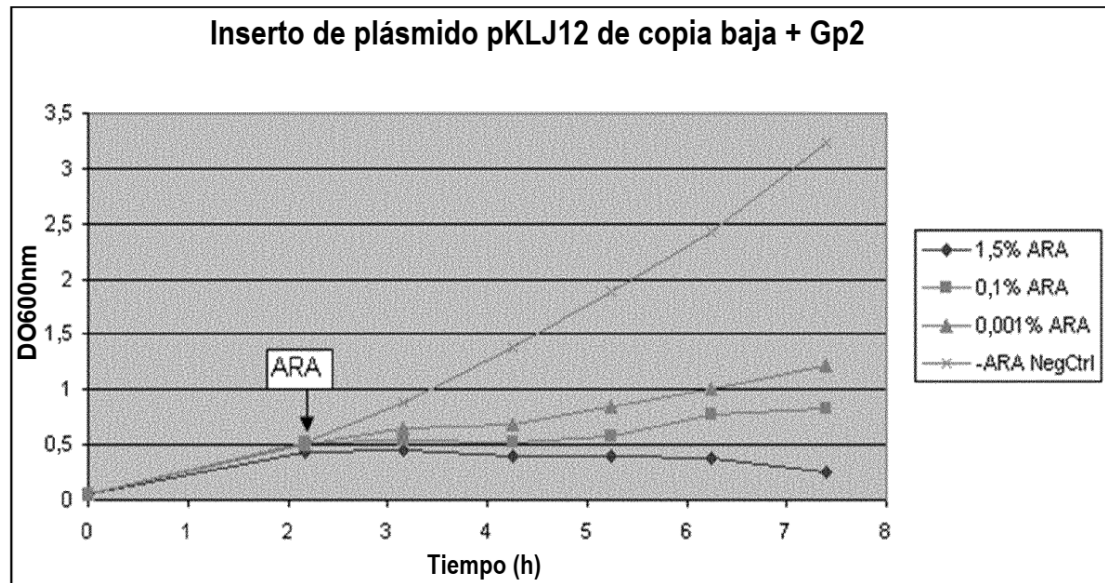


Figura 2

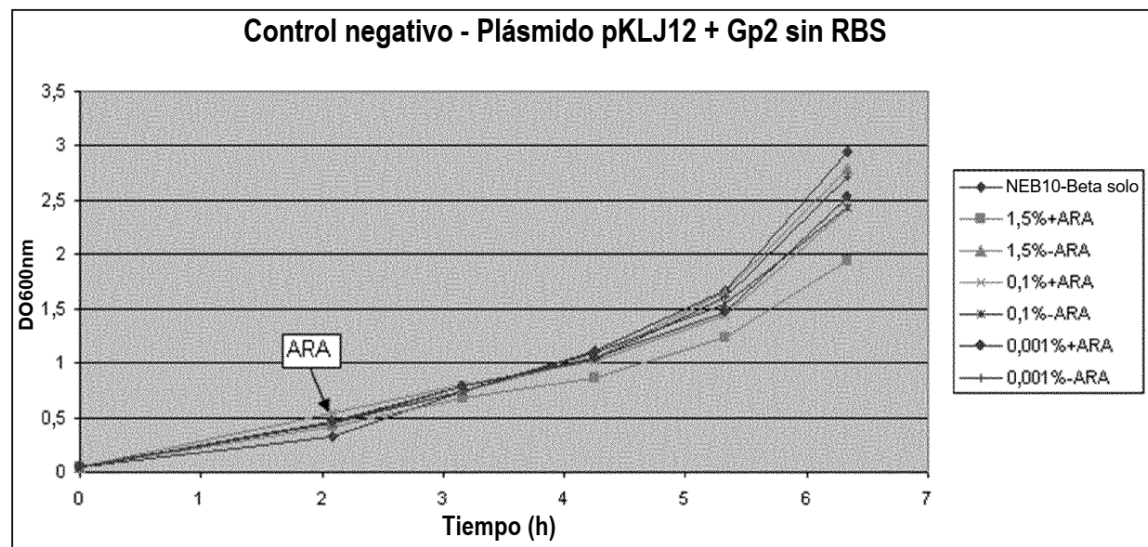


Figura 3

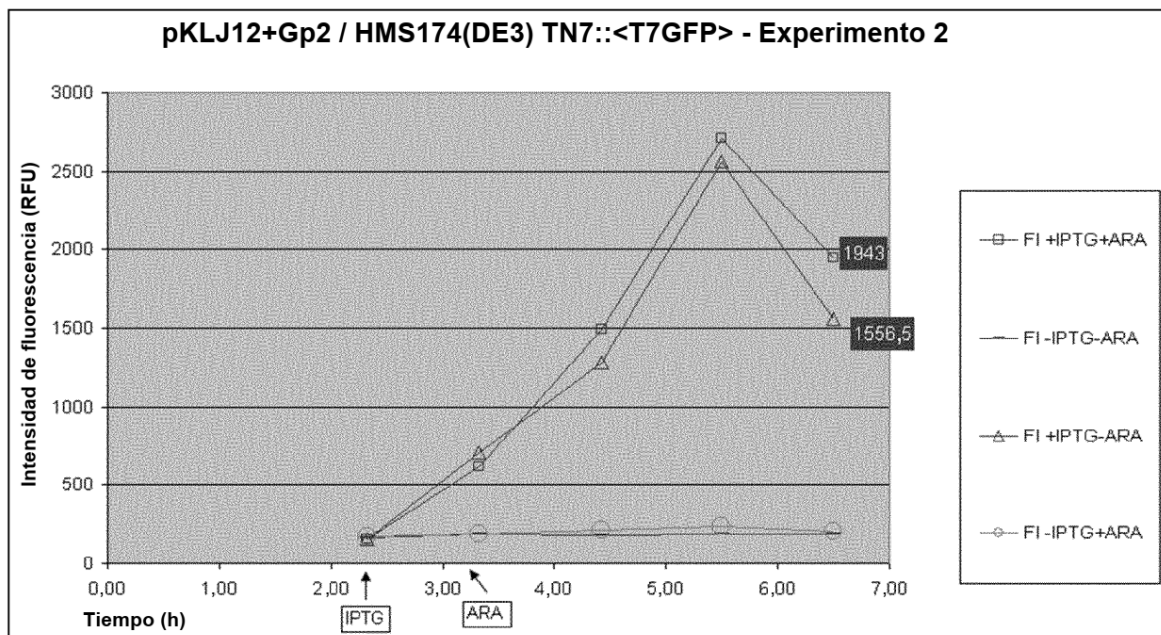
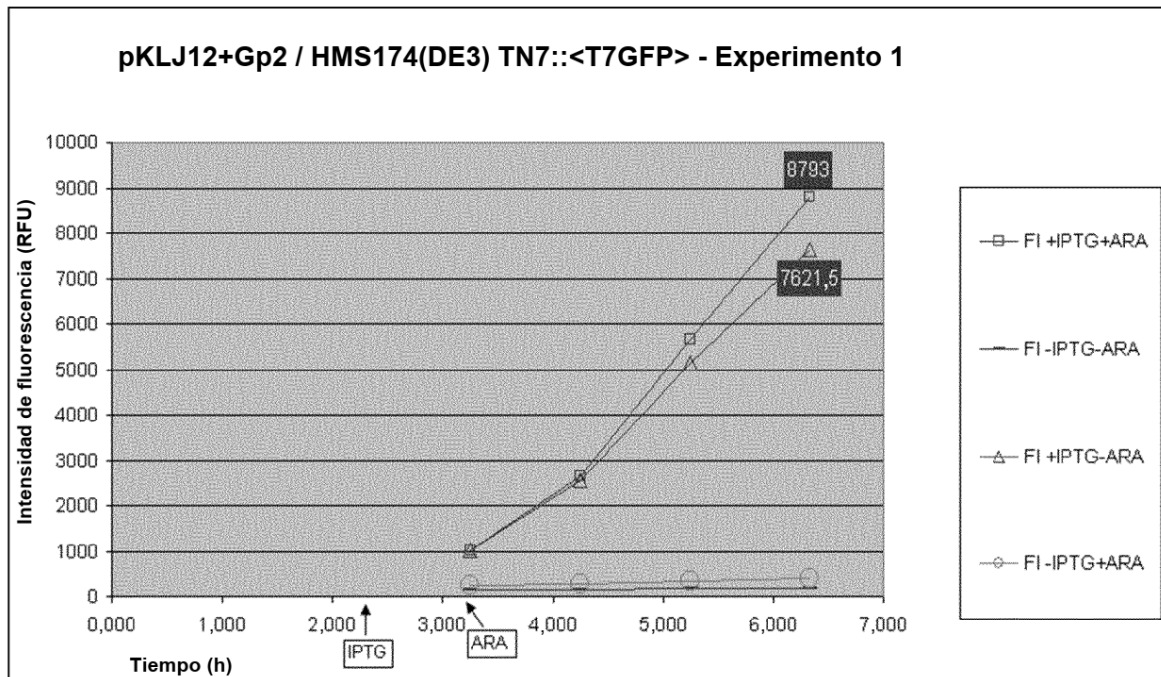


Figura 3
(cont.)

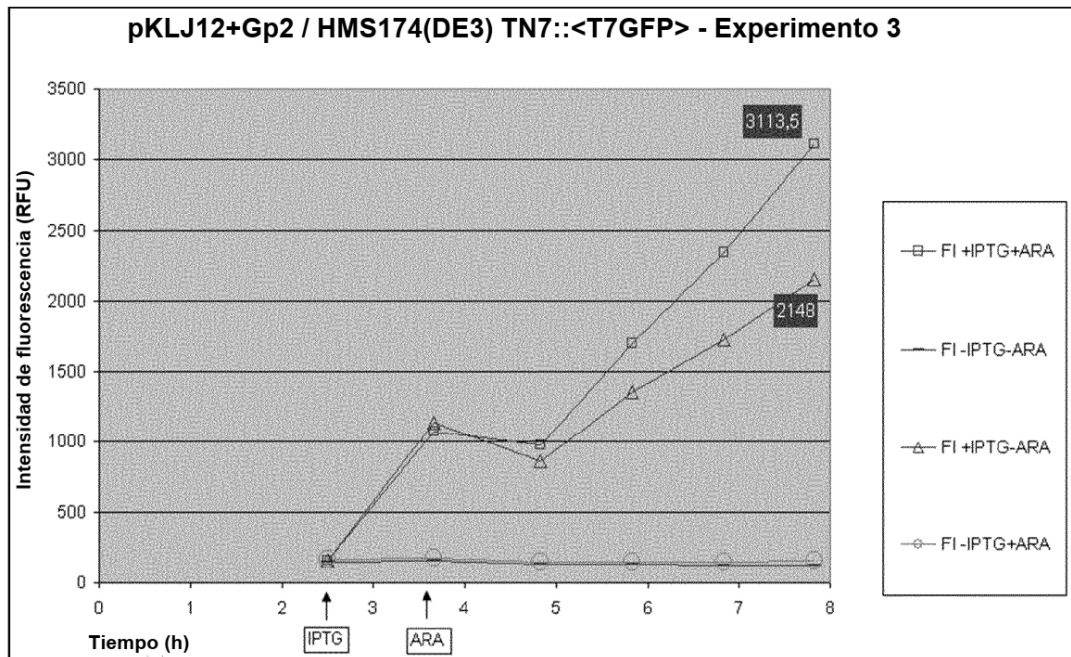


Figura 4

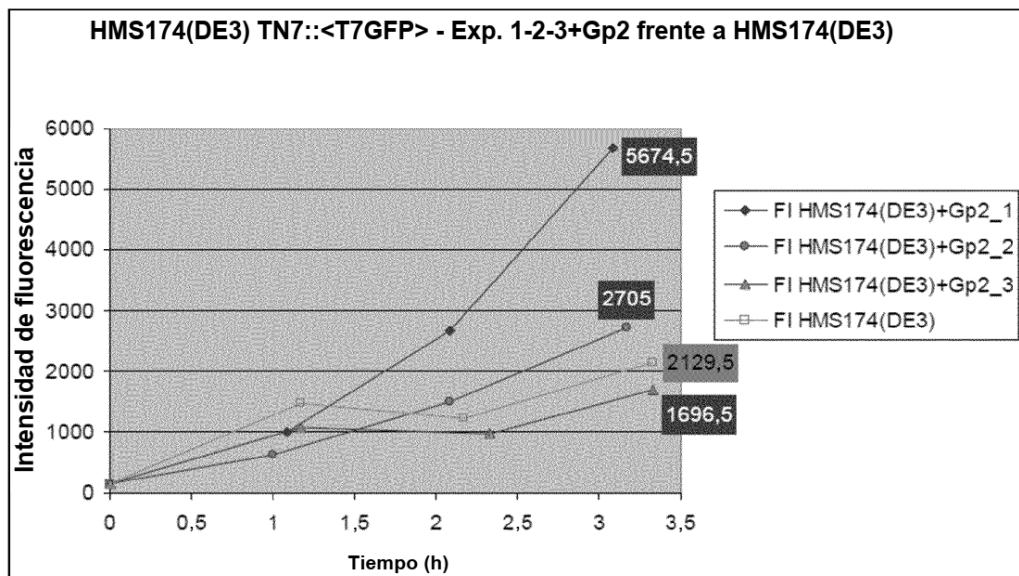


Figura 5

SEQ ID NO: 1 (Gp2)

MSNVNTGSLSDNKKFWATVESSEHSFEVPIYAETLDEALELAEWQYVPAGFEVTRVRPCVAPK

SEQ ID NO: 2 (Nun)

MVKKTIYVNPDSGQNRKVSDRGLTSRDRRRRIARWEKRIAYALKNGVTPGFNAIDDGPEYKINE
DPMDKVDKALATPFPRDVEKIEDEKYEDVMHRVVNHAHQRNPNKKWS

SEQ ID NO: 3 (Gp0.7)

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEV
ADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLT
SADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNV EEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSK
GLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAPEYAEAIAT
RAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVY
KAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAA
AVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGL
LTLAKGKPIGKEGYWYWKI HGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQD
SPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQ
DIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRS
VMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAM
NWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKPIQTRLNLMFLGQFRLQ
PTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAAN
LFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLNRDILESDFAF

SEQ ID NO: 4 (Gp6)

MRKSLIMGTKEDVAKMKAKRQMNAKAVTFAERYSTSEPVRRIVTFNHPAIKGM

SEQ ID NO: 5 (Gp8)

MEQLNYGYKIKRNQVRGSWFLVYGKPIYELHRGEKSKTYVTHIATGKTPACAGLLRDAIMKACMLEGLL

SEQ ID NO: 6 (A*)

MKSRRGFAIQRLMNAMRQAHADGWFIVFDLTLADDRLEAFYDNPNALRDYFRDIGRMVLAA
EGRKANDSHADCYQYFCVPEYGTANGRLHFHAVHFMRTLPTGSVDPNFGRRVRNRRQLNSL
QNTWPYGYSMPIAVRYTQDAFSRSGWLWPVDAKGEPLKATSYMAVG FYVAKYVNKKSDMDL
AAKGLGAKWNNSLKTKLSLLPKLFRIRMSRNF GMKMLTMTNLSTECLIQLTKLGYDATPFN
QILKQNAKREMRRLRGKVTVADVLAAPVTTNLLKFMRASIKMIGVSNLQSFASMTQKLTLSDI
SDESKNYLDKAGITTACLRIKSKWTAGGK

Figura 5 (cont.)

SEQ ID NO: 7 (YkzG, subunidad Epsilon)

MIYKVFYQEKADDEVVPREKTDSDLYIEGVSERDVRTKLKEKKFNIEFITPVDGAFLEYEQQSENFKVLEL

SEQ ID NO: 8 (GP40 del fago SPO1 de Bacillus)

MHIYTYWGLKYVPSNSTMVAKEGDLILLGNEVHKVVVLHFRNITDLQITNWKGTETRYNLHVTEYKVL
VPYDTHKEENEAMSDSLITHNGKDYVLCKIPARVGDLIRTEDKRVWEVLQKSKDGLVLYNEEKGEQSAV
YSEIGPYHVLVPRDTHPTREELA AVIMNKAFTRTETQDSQEDTGTHKGLGLTGTDLYHSLRDLDAKV
QSGYYTATENEEDVKSEIEATKKHMKAVKESGKTVNDYRKEENTKRCKLKALTNKNRFLKSVIDTDSL
QVGKAYLIGGRDMKNVHGLYTGTTFDQQHANFLIVETDRMHRTLTVSAEQLFAEERHIVDIEKRVEQTED

SEQ ID NO: 9 (GP67 del fago G1 de Staphylococcus)

MTNSKKKGDTFERKIAKELTAWWGYQFNRSPOSGGASWGKDNNAVGDIVVPQEANFPLVVECKHREWTIDNVLLNN
REPHTWWEQVINDSSKVNKTPCLIFTRNRAQSYVALPYDEKVYEDLRNNEY PVMRTDFIIDNIRKDKFFYDVLITTM
NGLTSFTPSYIISCYDKKDIKPYKKVESNLSEVSKHEDELINDLLSDI

SEQ ID NO: 10 (GP39 del fago P23-45 de Thermus thermophilus)

MVEGFVEPYIRLFEAIPDAETELATFYDADLDLTPPRMFLPSGDLYTPPGPVRLEEIKRKRVRVLVKVSIYRFEHVG
LGLAARPYAYAYAWQGDNGILHLYHAPVVLEDVPEVLELDEVTYNESYVRLMRAMGHVDAFIDL

SEQ ID NO: 11 (GP79 del fago PhiEco32 de enterobacterias)

MDMFSLEDLVQNGMMEQKEPLIVGSRKELRKLC EEWGITNQRMIGNQFSAIVTFLKRGDKYSMECVERIITEAQQDK
GVTYL

SEQ ID NO: 12 (P7 del bacteriófago Xp10 de Xanthomonas oryzae)

MNEFTQISGYVNAFGSQRGSVLTVKVENDEGWTLVEEDFDRADYGSDFEVAEVSSYLKRNGGIKDLTKVLTR

SEQ ID NO: 13 (Alc del fago T4 de enterobacterias)

MDLQLITTEMVVEAYGDTTGDGISVFKGNRRVGYITGLKKDLAKQVKRKTIIKEYRNRRLQARDMLPDAVEEMKVFL
ENQLAKYDCEVFINTQPNVHINSCKCYIIVNPLTGKHLGISNPNRSASDMAEDVEACFKISKSPAHHILINGLS
QDDIVEVIKTLICM

SEQ ID NO: 14 (Asia del fago T4 de enterobacterias)

MNKNIDTVREIITVASILIKFSREDIVENRANFIAFLNEIGVTHEGRKLNQNSFRKIVSELTQEDKKTILIDEFNECF
EGVYRYLEMYTNK

Figura 6

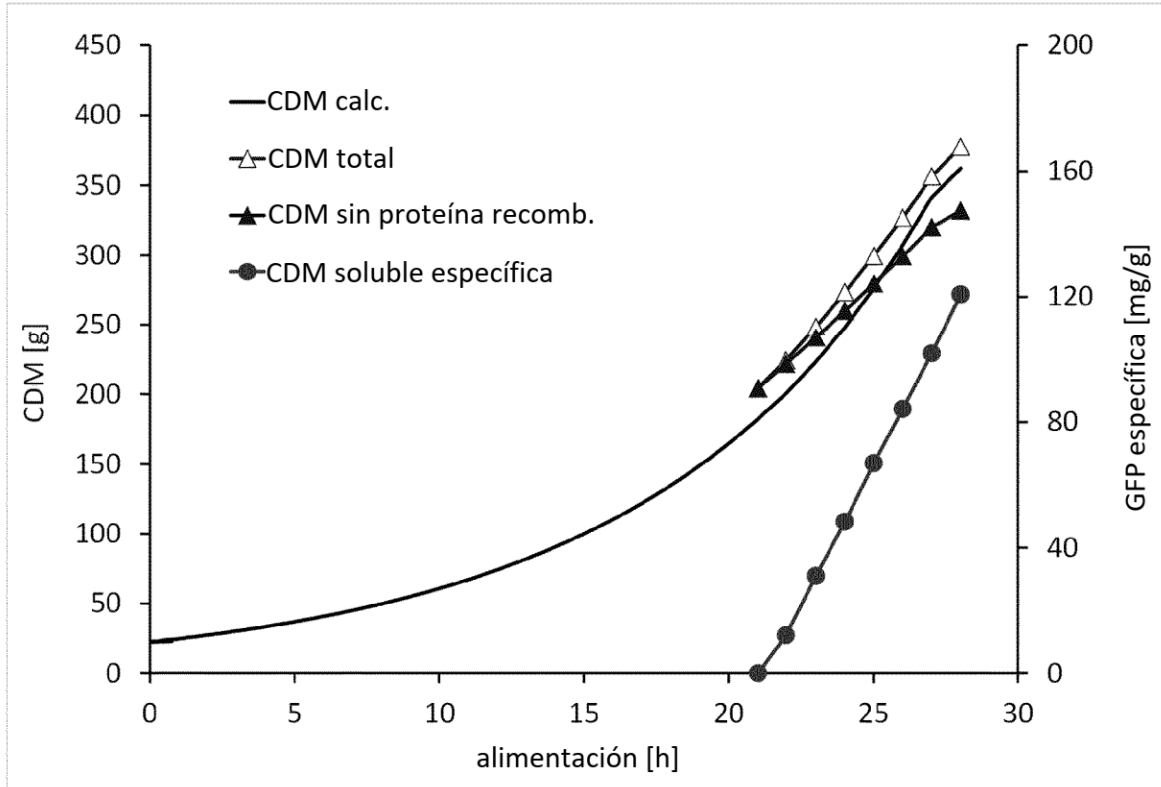


Figura 7

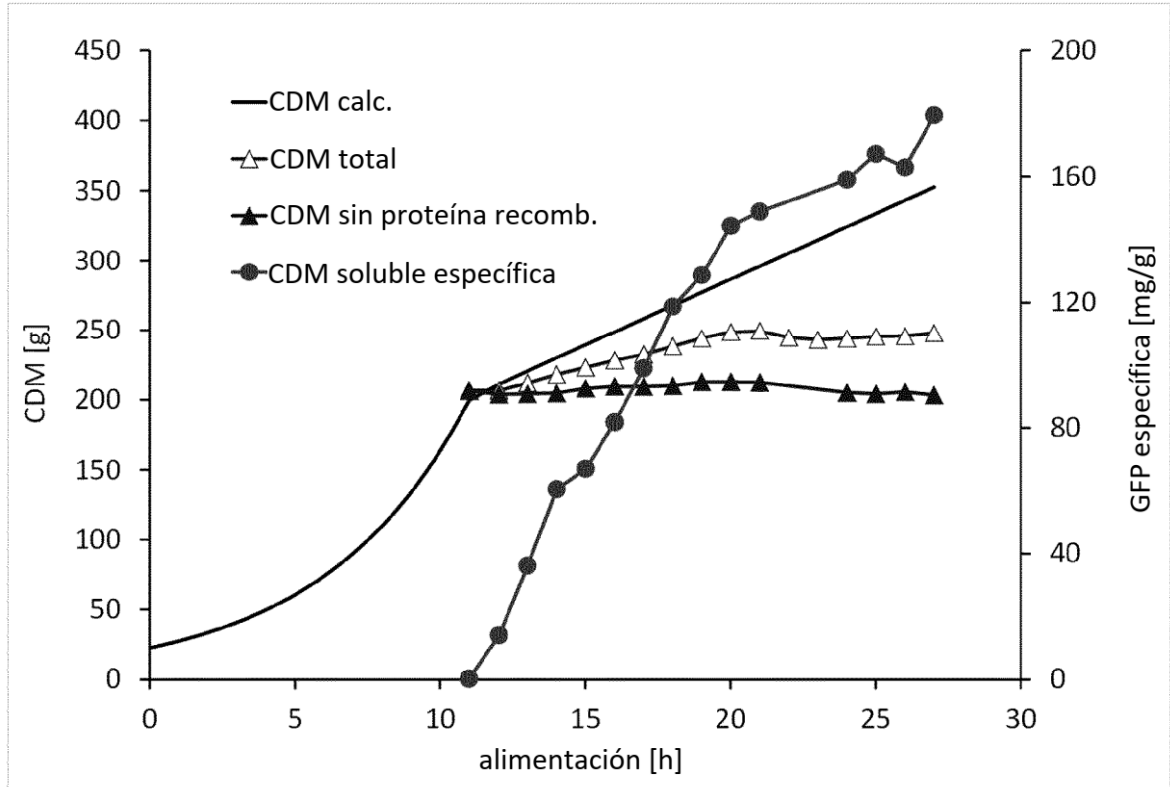


Figura 8

	Sistema desacoplado de crecimiento		Sistema estándar
	S	IB	S IB
GFP			
Lisozima			
horas inducidas	4 h	14 h	7h
GFP en la fracción de proteínas solubles	25 %	63%	28%

Figura 9

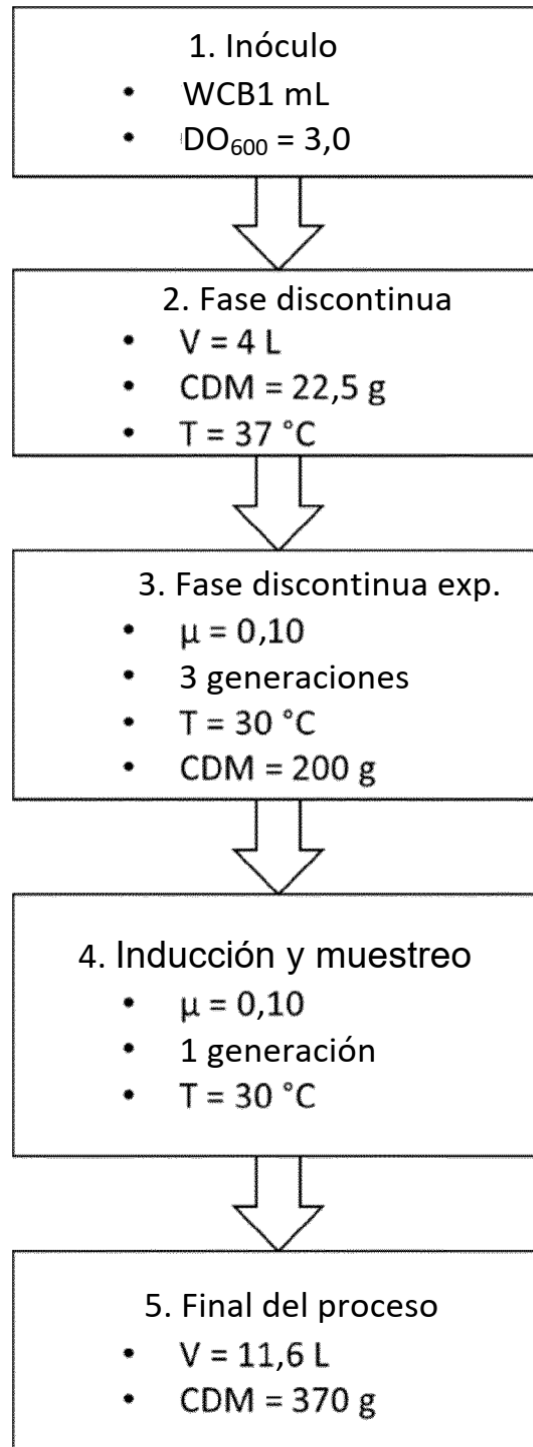


Figura 10

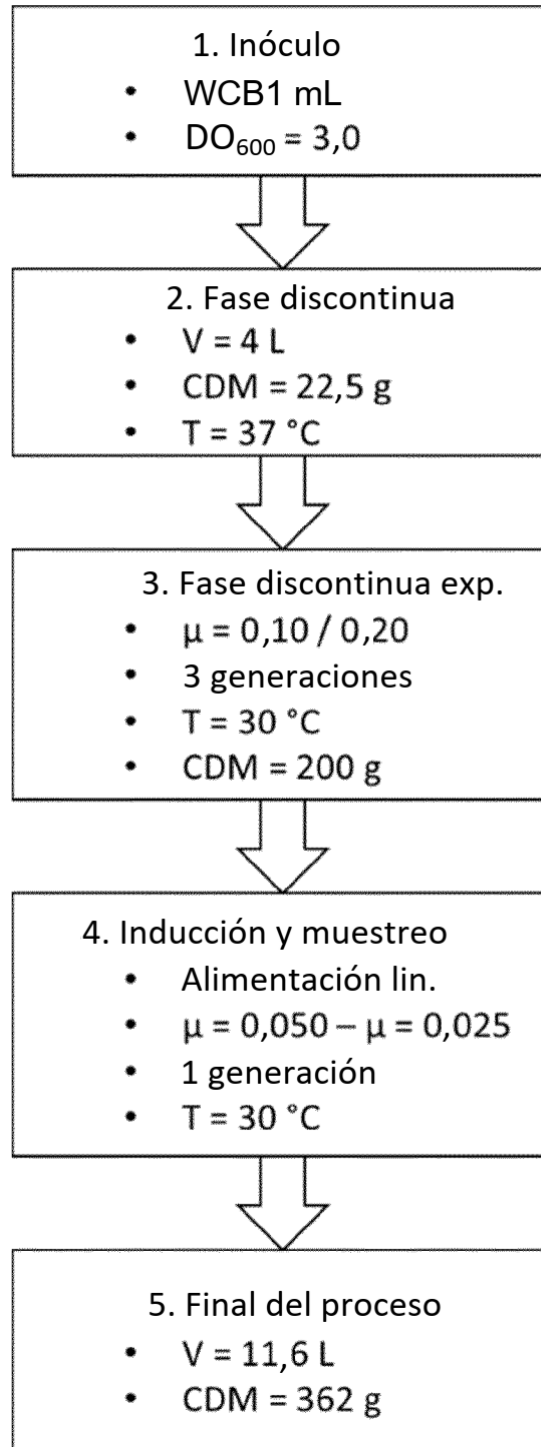


Figura 11

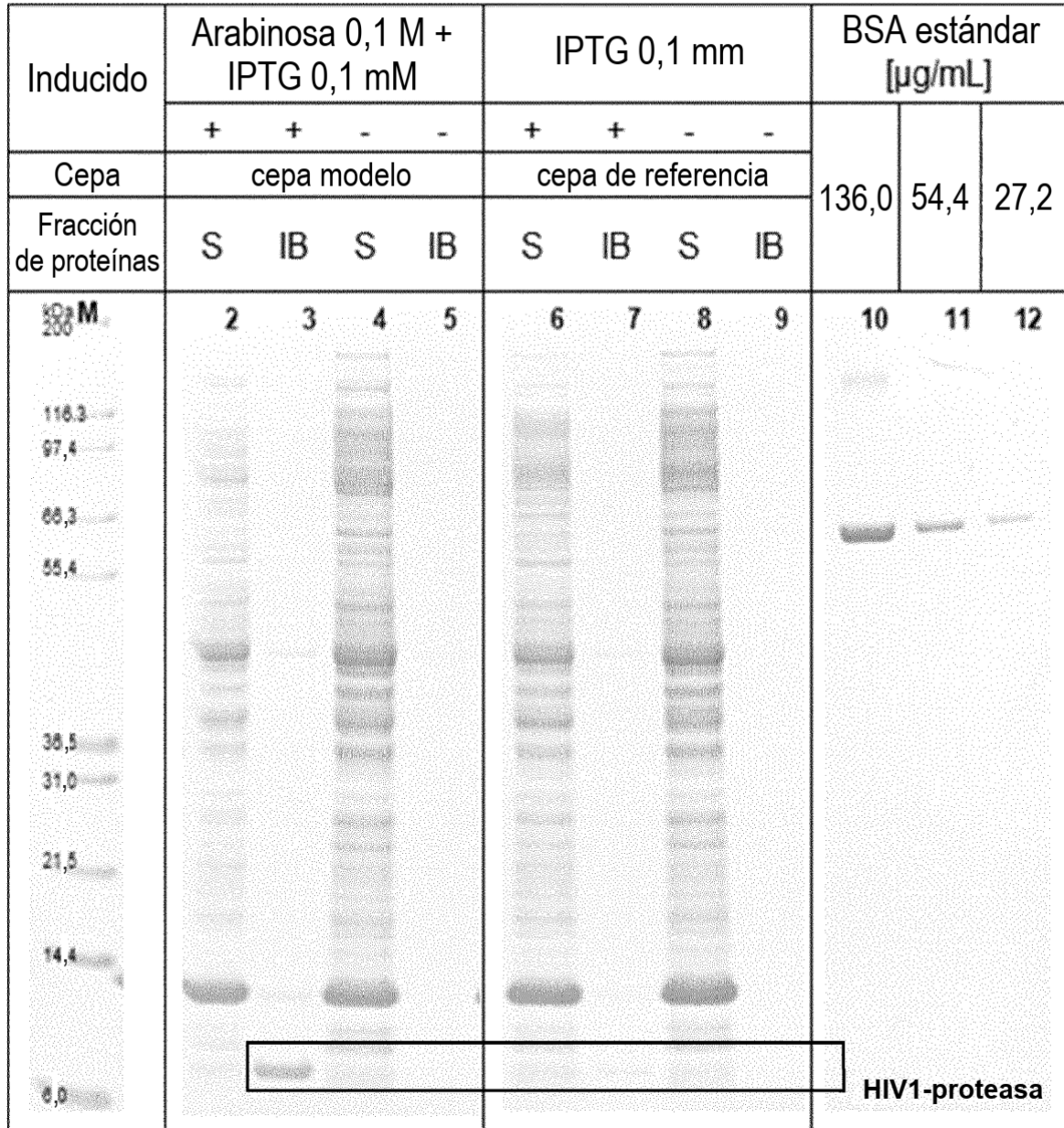


Figura 12

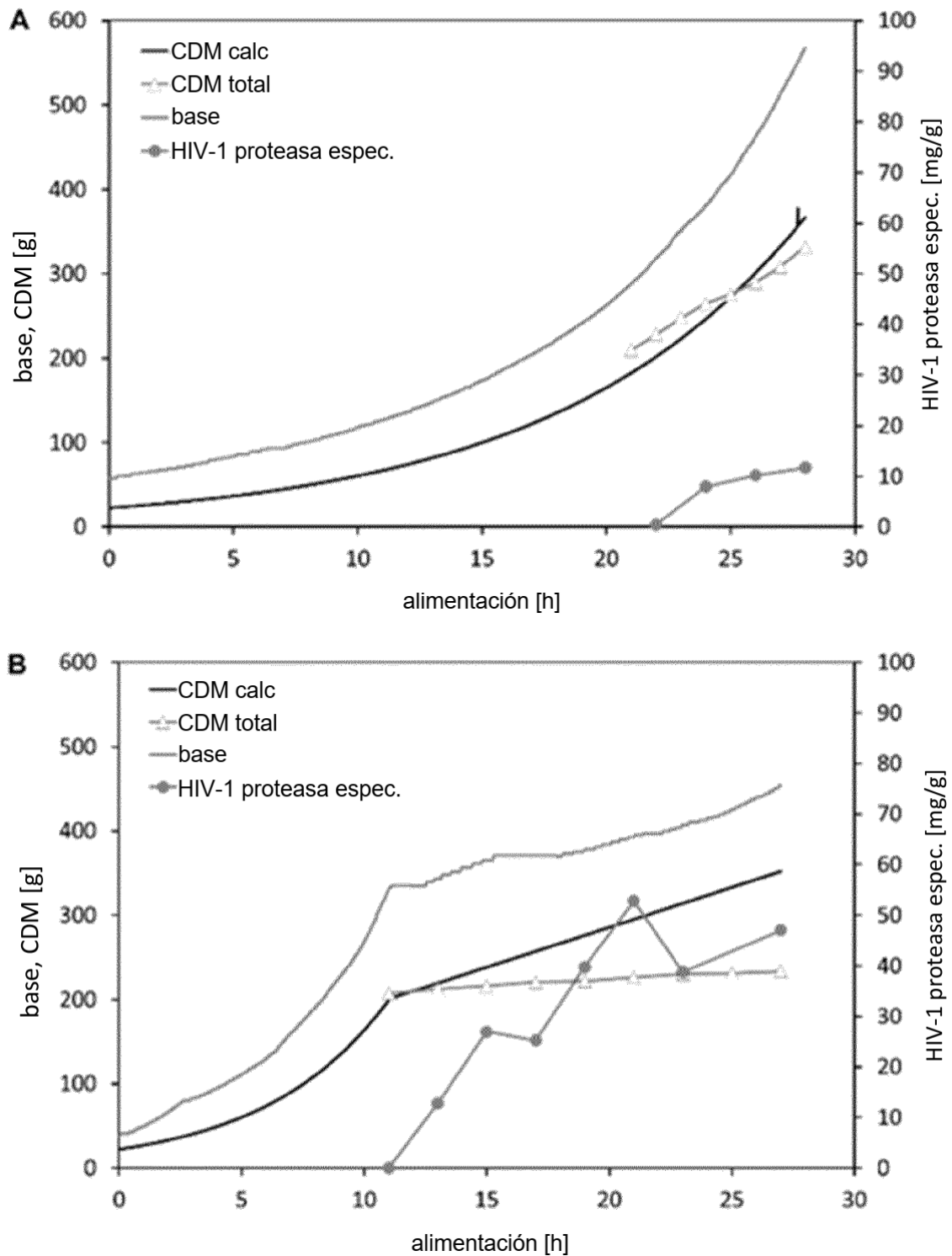
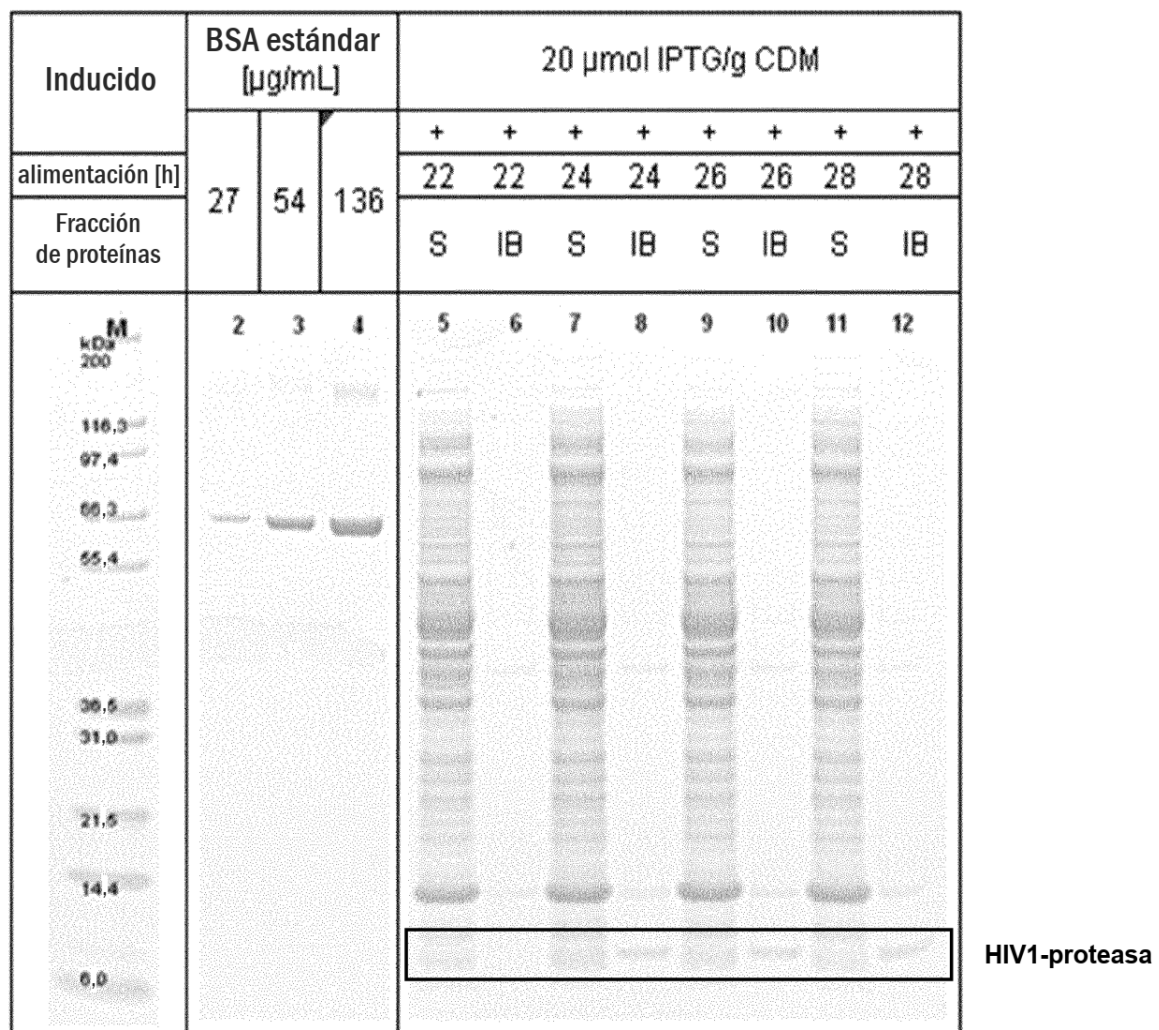


Figura 13



pocillo	vol. bruto	BSA/HIV1-P [μg/ml]
2	3,67E+07	22,9
3	1,31E+08	79,6
4	2,08E+08	125,4
5		
6	1,41E+06	1,7
7		
8	3,47E+07	21,7
9		
10	3,45E+07	21,6
11		
12	3,26E+07	20,4

Figura 14

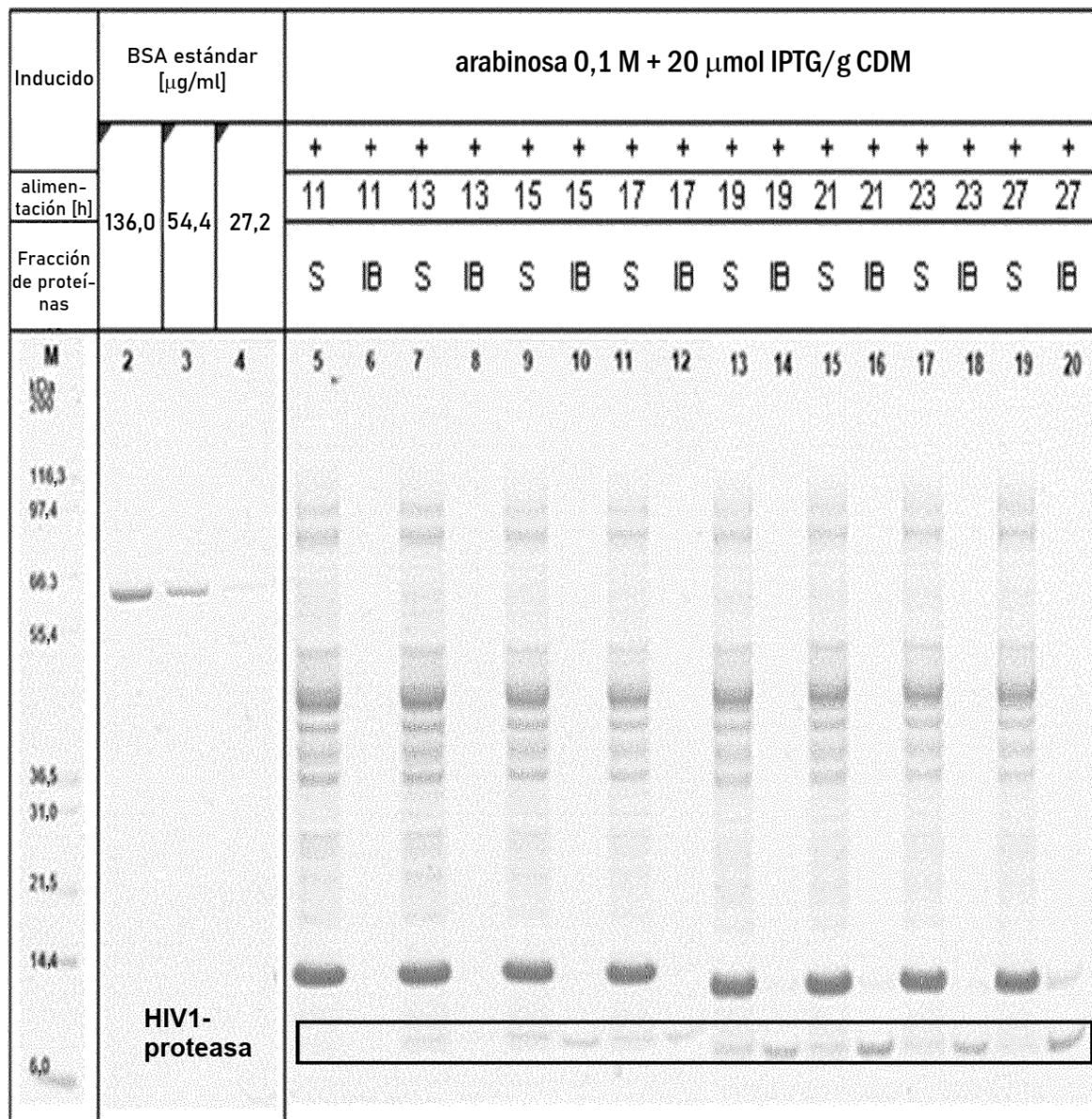


Figura 14 (cont.)

pocillo	vol. bruto	BSA/HIV1-P [µg/ml]
2	1,50E+08	146,4
3	7,52E+07	79
4	7,89E+06	19
5	0,00E+00	0
6	0,00E+00	0
7	2,01E+07	29,5
8	5,40E+06	16,3
9	2,60E+07	34,8
10	3,68E+07	44,5
11	2,24E+07	31,6
12	3,08E+07	39,2
13	3,00E+07	34,3
14	7,49E+07	70,2
15	2,60E+07	31,1
16	1,16E+08	103,1
17	1,92E+07	25,6
18	7,75E+07	72,3
19	1,44E+07	21,8
20	1,07E+08	96,0

Figura 15

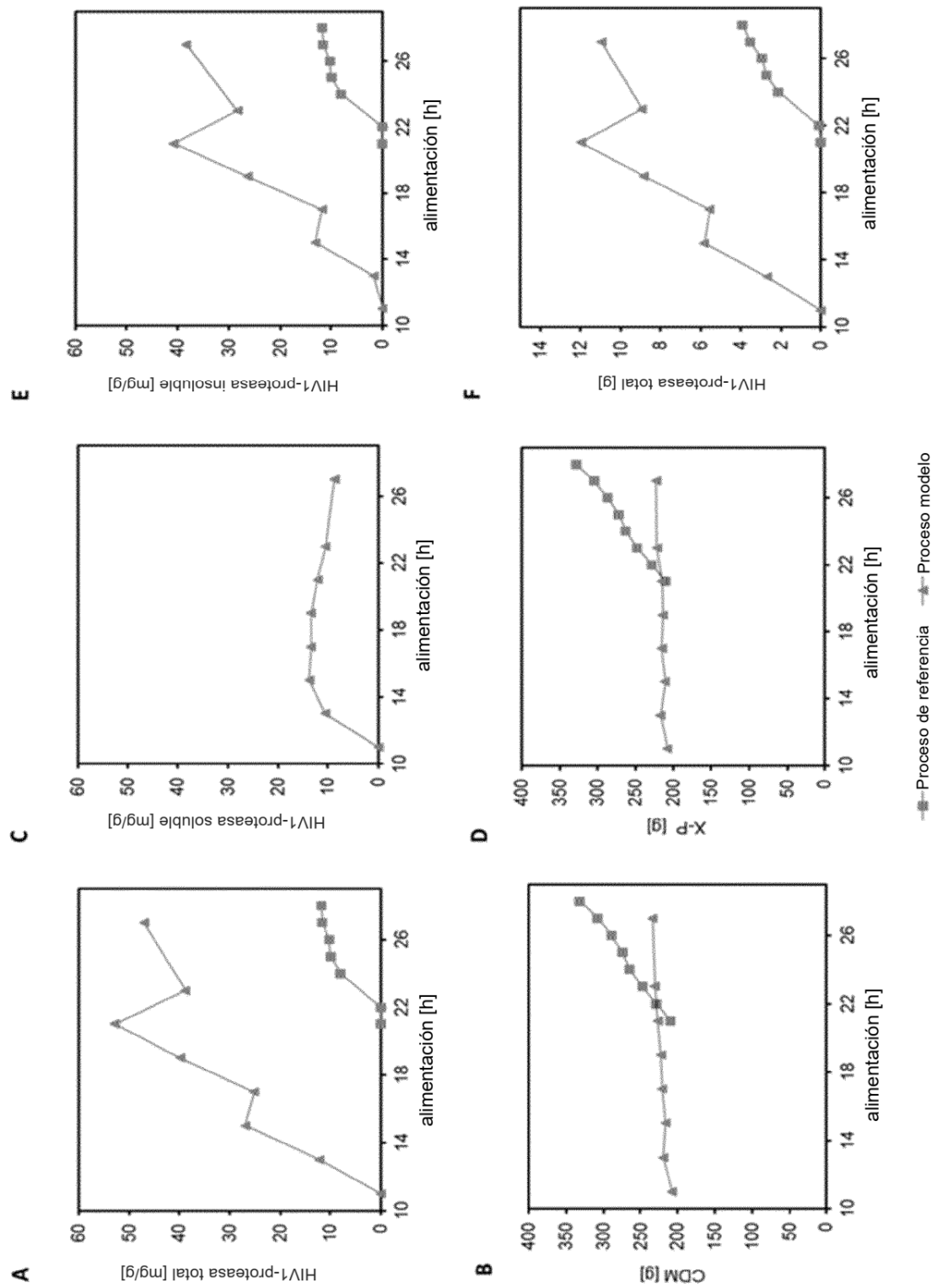


Figura 16

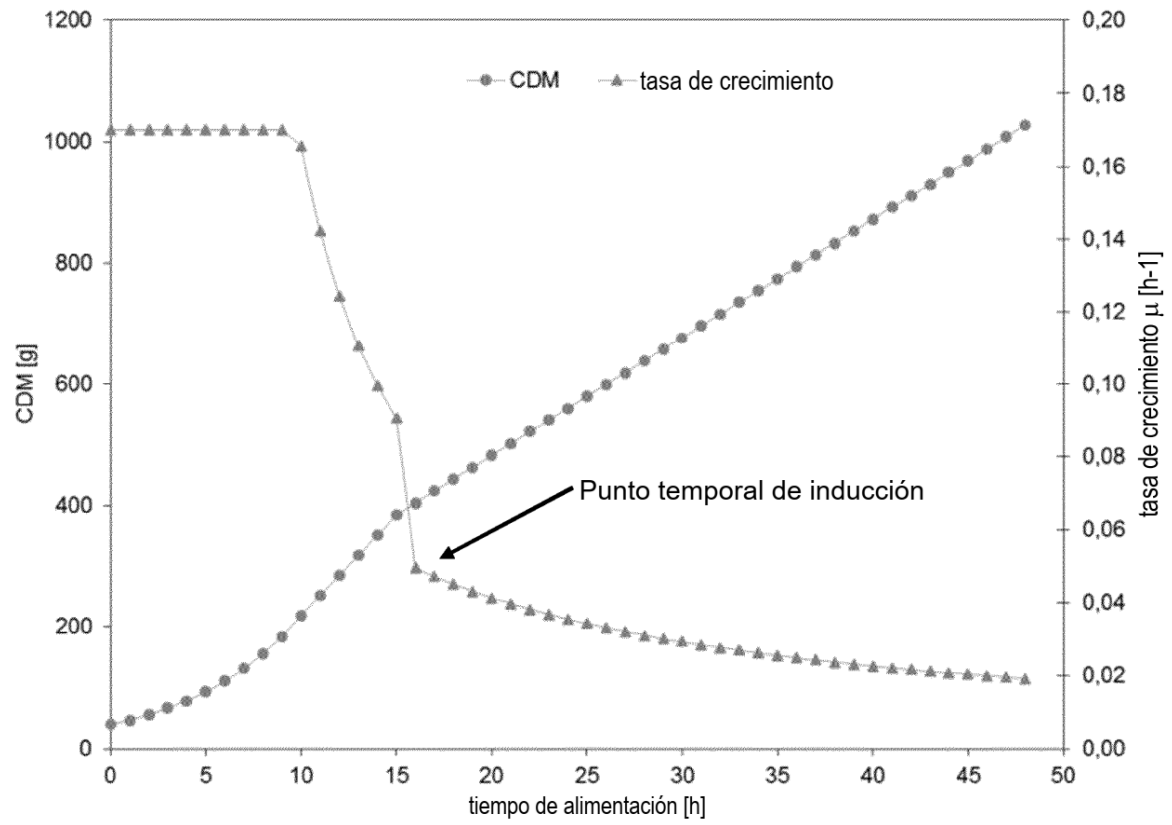


Figura 17

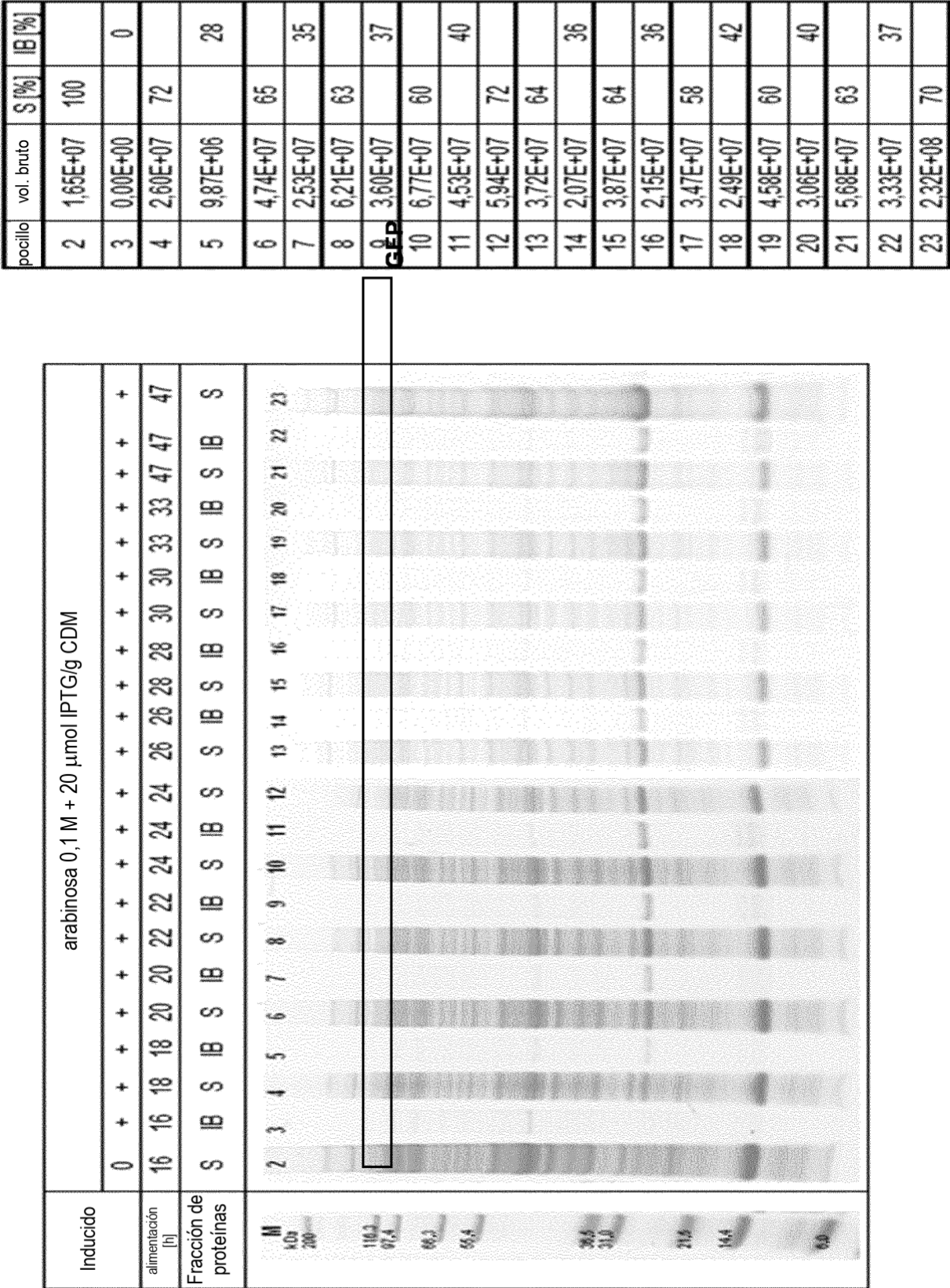


Figura 18

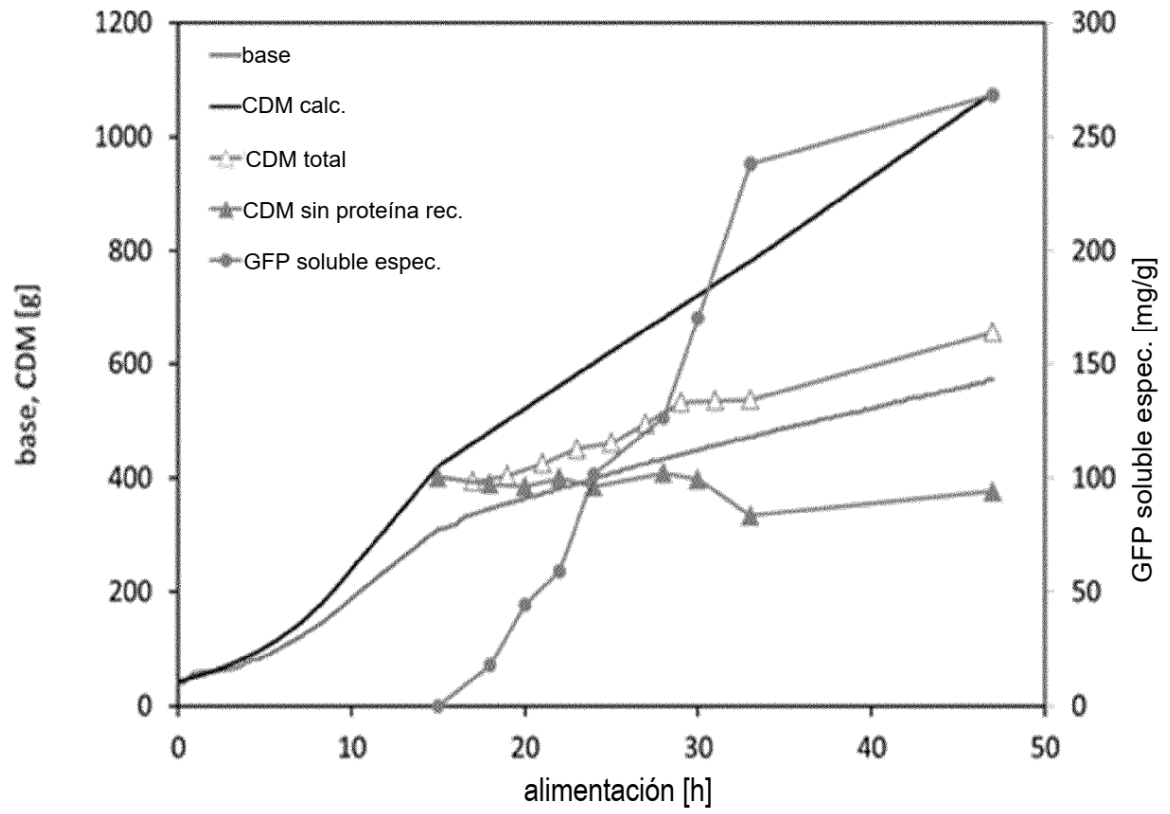


Figura 19

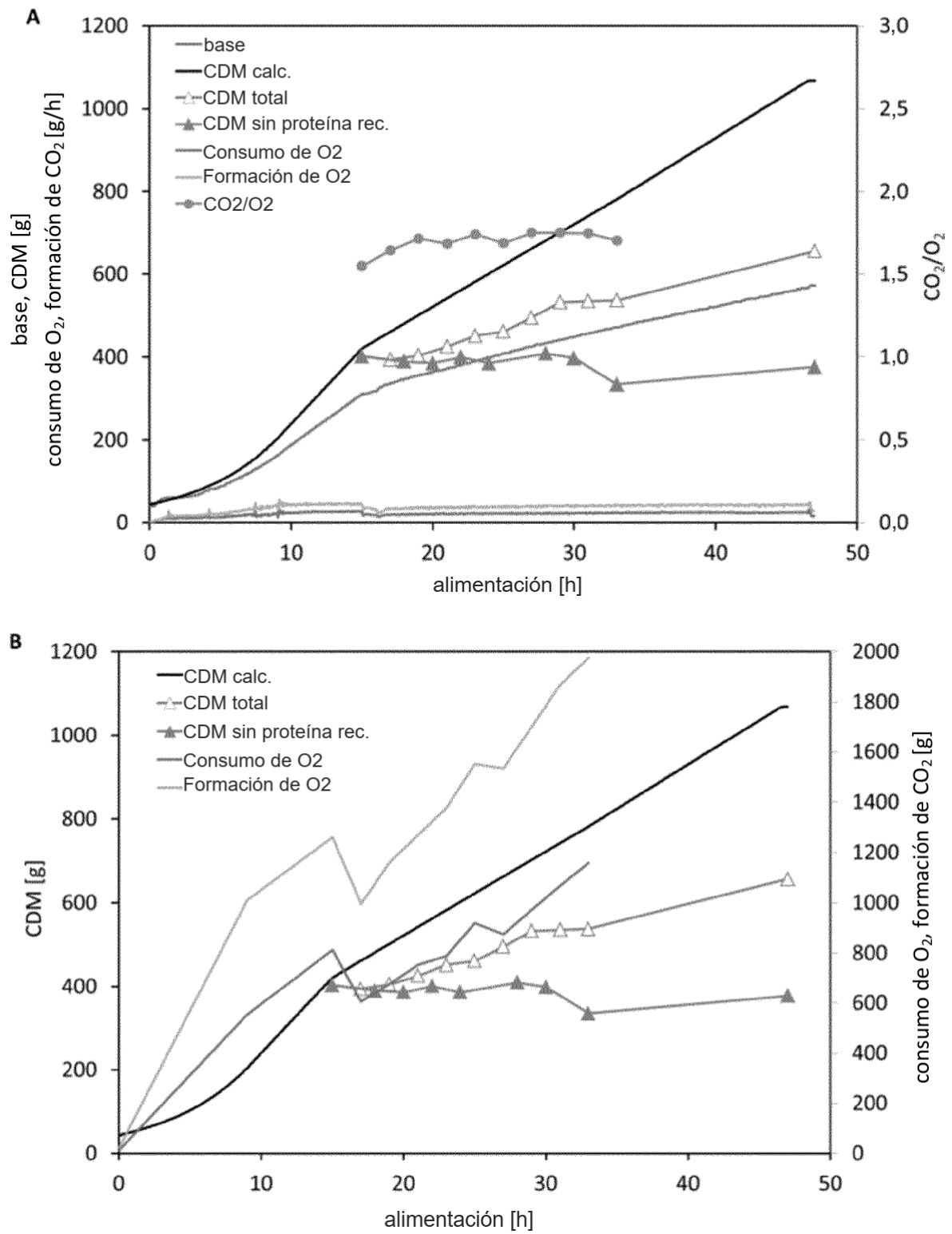


Figura 20

