



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 295 151**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01922467 .4**
⑧6 Fecha de presentación : **19.03.2001**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1268823**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

⑤4 Título: **Métodos y células mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes.**

③0 Prioridad: **24.03.2000 US 192129 P**
27.03.2000 US 192238 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

⑦3 Titular/es: **XOMA Technology Ltd.**
2910 Seventh Street
Berkeley, California 94710, US

⑦2 Inventor/es: **Better, Marc, D.**

⑦4 Agente: **Gallego Jiménez, José Fernando**

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

Métodos y células mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes.

La presente invención se refiere en general a métodos mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*, en células huésped bacterianas que son deficientes en uno o más de los sistemas de transporte activos para un inductor. En el caso del promotor *araB*, el inductor es L-arabinosa. La presente invención se refiere también a células huésped bacterianas mejoradas que son deficientes en uno o más de los sistemas de transporte activo para un inductor, tal como la L-arabinosa, y que contienen un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*.

Antecedentes de la invención

Aunque se han descrito muchos sistemas para la expresión de proteínas recombinantes, incluyendo péptidos y polipéptidos, en sistemas microbianos, la mayoría de los sistemas de expresión génica en bacterias gram-negativas tales como la *Escherichia coli* se han basado exclusivamente en un conjunto limitado de promotores bacterianos. Los promotores bacterianos usados más ampliamente han incluido los promotores de la lactosa [*lac*] (Yanisch-Perron *et al.*, 1985, *Gene* 33: 103-109), y del triptófano [*trp*] (Goeddel *et al.*, 1980, *Nature (Londres)* 287:441-416), y los promotores híbridos obtenidos a partir de estos dos [*tac* y *trc*] (Brosius, 1984, *Gene* 27: 161-172; y Amanna y Brosius, 1985, *Gene* 40: 183-190). Otros promotores bacterianos usados comúnmente incluyen los promotores del fago lambda P_L y P_R (Elvint *et al.*, 1990, *Gene* 37: 123-126), el promotor del fago T7 (Tabor y Richardson, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 1074-1078), y el promotor de la fosfatasa alcalina [*pho*] (Chang *et al.*, 1986, *Gene* 44: 121-125). Cada uno de estos promotores tiene características deseables. No obstante, el promotor ideal para la expresión de una amplia variedad de proteínas recombinantes ofrecería ciertas características que no se encuentran en estos sistemas usados comúnmente. Por ejemplo, muchos productos recombinantes pueden ser tóxicos para el huésped de expresión. Por esta razón, con frecuencia es preferible que el promotor regule de forma ajustada la expresión génica durante la propagación del cultivo cuando la expresión génica no es deseable. Por el contrario, cuando se desea la expresión génica, el promotor se debe controlar fácilmente y con frecuencia se prefiere un nivel de expresión elevado. El agente o la condición del entorno que inicia la expresión génica debería ser sencillo de usar e idealmente con un coste bajo. En general, lo más deseable es un sistema regulado de forma ajustada. Las características de un promotor y un sistema de expresión general que son las más preferidas incluyen una expresión génica reprimida de forma ajustada en ausencia de un inductor y una expresión génica altamente desreprimida en presencia de un inductor. También sería deseable un sistema que permitiera que el nivel de expresión de un producto recombinante fuera proporcional a la cantidad de agente inductor añadido al cultivo celular.

Hahn, *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 155 (2): 593-600 describe la regulación *in vivo* del promotor *araC* en *Escherichia coli*. En particular, Hahn, *et al.*, describe la desrepresión y el restablecimiento subsiguiente de la represión del P_C después de la adición de arabinosa.

Uno de los sistemas promotores bacterianos que ha demostrado resultar particularmente ventajoso para proporcionar una expresión génica reprimida de forma ajustada en ausencia del inductor arabinosa y una expresión génica altamente desreprimida en presencia del inductor arabinosa es el promotor *araB* de la familia *Enterobacteriaceae*. Resulta interesante la patente U.S. No. 5.028.530, la cual describe el uso del sistema de expresión del *araB* para la producción de polipéptidos, incluyendo cecropinas, mediante técnicas microbiológicas. Dos características del sistema *ara* lo hacen particularmente bien adecuado para la expresión de productos recombinantes en bacterias tales como *E. coli*. En primer lugar, resulta sencillo de aprovechar ya que los elementos de control del promotor *araB* están contenidos de forma adecuada en una región reguladora de aproximadamente 300 pares de bases y únicamente se necesita de forma adicional una secuencia codificante funcional para el gen *araC*. En segundo lugar, la regulación del sistema ha demostrado ser particularmente ajustada, es decir, la relación de la cantidad de producto en el estado inducido (con arabinosa) con respecto a la correspondiente en el estado reprimido (sin arabinosa) a partir del promotor *araB* en plásmidos de expresión multicopia es relativamente alta, con la mayor frecuencia se encuentra en el intervalo de entre >200 y 75.000 (Better *et al.*, 1999, *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*. Academic Press, Nueva York, págs. 95 a 107). Adicionalmente, el nivel no inducido de expresión proteica del sistema *ara* es muy bajo. Esta característica resulta particularmente importante y útil cuando se van a expresar productos proteicos, incluyendo péptidos y polipéptidos recombinantes, que son tóxicos para el huésped.

Las bacterias tales como la *E. coli* tienen dos sistemas conocidos para el transporte activo de arabinosa a la célula. El primero de estos sistemas es un proceso de acumulación dependiente de la energía, inducible, catalizado por el producto del gen *araE*. El producto del gen *araE* es una proteína asociada a membrana, de aproximadamente 52.000 Da, que constituye el sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad (Maiden *et al.*, 1988, *Journal of Biol. Chem.* 263: 8003-8101). El segundo sistema de transporte de L-arabinosa tiene una mayor afinidad para la L-arabinosa y depende de la actividad de la proteína de unión a la L-arabinosa, AraF. El locus que codifica esta proteína de unión a la arabinosa, *araF*, es parte de un operón con *araG* y *araH*. Los productos proteicos de estos tres genes, *araFGH*, constituyen el sistema de transporte de L-arabinosa de alta afinidad (Horazdovsky y Hogg, 1989, *Jour. of Bacter.* 171: 3053-3059). Se han preparado cepas mutantes de *E. coli* deficientes en el transporte de arabinosa (ver, por ejemplo, Maiden *et al.*, *supra*, Harazdovsky y Hogg, *supra*).

Son interesantes las descripciones de las siguientes referencias que tratan sobre el uso de promotor *araB* para la expresión de polipéptidos en bacterias.

Johnston *et al.*, 1985, *Gene* 34: 137-145, describieron el vector pING1 que contenía la región reguladora del *ara*, el gen *araC* completo y una parte del gen *araB* de *S. typhimurium*. En la región codificante del gen *araB* se introdujeron sitios de restricción de manera que se pudiera expresar una fusión génica o una unidad de transcripción multigénica bajo el control de arabinosa. Este sistema se usó para expresar proteínas (bacterianas) homólogas las cuales normalmente se expresan en *E. coli* bajo ciertas circunstancias, a saber se usaron las proteínas del gen II M13 (Johnston *et al.*, 1985) y del gen 8 (Kuhn y Wickner, 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 15907-15918), y un vector similar para expresar la proteína RepE a partir del plásmido F de *E. coli* (Masson *et al.*, 1986, *Nucleic Acids. Res.* 14: 5693-5711). Cada una estas proteínas se produjo en el citoplasma de células de *E. coli*, y por lo menos parte de la proteína expresada era soluble y se podía detectar en una forma activa en extractos bien *in vivo* o bien en célula.

Better *et al.*, 1988, *Science* 240: 1041-1043, describieron un sistema de expresión con *araB* derivado del pING1 que subsiguientemente se modificó genéticamente para regular la expresión de proteínas recombinantes heterólogas (no bacterianas). Las proteínas heterólogas producidas satisfactoriamente con el sistema de expresión con *araB* en *E. coli* incluyen dominios Fab de las inmunoglobulinas. En este caso, el sistema de expresión con *araB* se usó para dirigir la producción de polipéptidos unidos directamente a secuencias señal hidrófobas a través de la membrana citoplásmica bacteriana en la que se acumularon los Fab en la configuración completamente activa, y correctamente plegada, y en la que los mismos se podían recuperar directamente a partir del sobrenadante del cultivo. La expresión de dominios Fab bajo el control transcripcional del promotor *araB* fue la primera demostración de que se podía producir una proteína heteróloga, heterodimérica, en *E. coli*. El nivel de expresión publicado inicialmente fue aproximadamente de entre 1 y 2 µg/mL, aunque en estudios subsiguientes el nivel de expresión proteica se pudo incrementar casi 1.000 veces haciendo crecer las bacterias a una densidad celular elevada en un fermentador (Better *et al.*, 1990, *ICSU Short Rep.* 10: 105). Por contraposición, Clark *et al.*, 1997, *Immunotechnology* 3: 217-226, encontraron que los genes Fab bajo el control de *lac* pueden inhibir el crecimiento bacteriano, y también que la expresión de los Fab a partir de P_{BAD} se reprimía de forma más ajustada que a partir de P_{lac}.

Better *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 16712-16718; Nolan *et al.*, 1993, *Gene* 134: 223-227; y Bernhard *et al.*, 1994, *Bioconjugate Chem.* 5: 126-132, mostraron claramente que el sistema de expresión *araB* se podía usar satisfactoriamente para la producción de otras proteínas. Se expresaron varias proteínas vegetales y fúngicas inactivadoras de ribosomas bajo el control directo de arabinosa *E. coli*. Una de estas proteínas, la gelonina, se expresó en forma de una proteína secretada en *E. coli* y se acumuló a un valor mayor que 1 g/L como una proteína totalmente activa en el sobrenadante del cultivo libre de células. Se expresaron también proteínas de fusión entre dominios de anticuerpos que se pueden dirigir a antígenos en células humanas y moléculas citotóxicas tales como la gelonina bajo el control transcripcional de arabinosa, Better *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 14951-14957. Estas proteínas de inmunofusión se acumularon en el sobrenadante del cultivo libre de células a partir de células inducidas por arabinosa a un valor mayor que 400 mg/L. Miembros de una familia de proteínas de inmunofusión expresadas en *E. coli* bajo el control transcripcional del promotor *araB* conservaron tanto *in vitro* como *in vivo* una actividad biológica comparable a la de inmunos conjugados preparados químicamente, elaborados a partir de anticuerpos totales producidos por células animales y proteínas inactivadoras de ribosomas purificadas directamente a partir de vegetales.

Jacobs *et al.*, 1989, *Gene* 83: 95-103 y Romeyer *et al.*, 1990, *Appl. Environ Microbiol.* 56: 2748-2754, usaron también plásmidos derivados del pING1 para codificar proteínas de mamíferos que se pueden llegar a localizar en la membrana celular exterior de bacterias. En uno de los ejemplos, un gen humano de la metalotioneína II se unió al fragmento líder y asociado a membrana de la lipoproteína Lpp de *E. coli* (Jacobs *et al.*, 1989). Cuando se produjo la inducción con arabinosa, las bacterias que llevaban este vector de expresión dirigieron una proteína de metalotioneína activa hacia la membrana celular exterior. La proteína recombinante se produjo a ~75.000 veces con respecto al nivel no inducido. Este sistema se usó para expresar una proteína heteróloga activa que anteriormente había resultado un tanto tóxica e inestable en *E. coli*.

Cagnon *et al.*, 1991, *Protein Eng.* 4: 843-847, describieron una serie de vectores de expresión que contenían el sistema de expresión con *ara* a partir del pING1 en el vector pKK233.2 junto con una serie de otras características opcionales. En la serie de vectores de expresión de Cagnon, la región promotora/operadora de *araB* venía seguida por una región *polylinker* para una clonación génica adecuada. Adicionalmente, algunos vectores contenían secuencias señal sintéticas, un origen de replicación del fago f1, y secuencias promotoras *araB* mutadas. El promotor *araB* mutado incorporaba cambios en la región -10 que consiguieron que el promotor se correspondiera de forma más próxima a un promotor de *E. coli* consensuado. Las mutaciones del promotor dieron como resultado un mayor nivel de expresión inducible (de 2 veces) para un gen marcador, aunque el nivel de expresión no inducido también se incrementó. Se expresaron varias proteínas recombinantes a partir de esta familia de vectores de expresión con *ara* incluyendo la proteína Tat de longitud completa del virus VIH (Armengaud *et al.*, 1991, *FEBS Lett.* 282: 157-160) y las proteínas bacterianas: β-galactosidasa (Cagnon *et al.*, 1991), la proteína de unión a bleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* (Cagnon *et al.* 1991), y la subunidad B de la toxina colérica (Slos *et al.* 1994, *Protein Express. Purif.* 5: 518-526). La subunidad B de la toxina colérica (CT-B) se unió a la secuencia señal de *ompA* y se expresó como una proteína secretada. La CT-B se acumuló a aproximadamente un 60% de la proteína periplásmica total y la CT-B se produjo a aproximadamente 1 g/litro a escala piloto. La mayor parte de la CT-B se liberó al medio de cultivo y se pudo recuperar a valores de rendimiento mayores que el 80% a partir del medio de cultivo libre de células.

Perez-Perez y Gutierrez, 1995, *Gene* 158: 141-142, describieron un sistema de expresión con *ara* en pACYC184 que se mantiene compatible con plásmidos derivados de ColE1 en un huésped de expresión.

Guzman *et al.*, 1995, *J. Bacteriol.* 177: 4121-4130, describieron una serie de vectores de expresión con *araB* que incorporan varios sitios de clonación múltiple y marcadores seleccionables. Esta serie de vectores se estudió exhaustivamente para la expresión de proteínas nativas de *E. coli*. Guzman *et al.* (1995) presentaron también pruebas de que el sistema con *araB* se puede usar “para lograr niveles muy bajos de expresión no inducida, obtener niveles moderadamente altos de expresión en presencia de un inductor, y modular la expresión en relación con una amplia gama de concentraciones del inductor”. Se planteó la posibilidad de que el alcance de la inducción por arabinosa se puede regular según la cantidad de inductor añadido al cultivo.

Otros han publicado que la expresión génica bajo el control del promotor *araB* parecía estar regulada directamente por la concentración de arabinosa introducida en el medio de cultivo (Lutz y Bujard, 1997, *Nucleic Acids Research* 25: 1203-1210; y Carrier *et al.*, 1998, *Biotechnol. Bioengineering* 59: 666-672). No obstante, por contraposición Siegel y Hu, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 8168-8172, demostraron que la expresión génica a partir de plásmidos que contenían el promotor *araB* a concentraciones de arabinosa subsaturantes representa en realidad la población media de poblaciones mixtas de células inducidas y no inducidas. De este modo, los niveles de expresión intermedios en el cultivo simplemente reflejaban el valor medio de las células inducidas y no inducidas en la población, no una regulación directa. Siegel y Hu, *supra*, construyeron plásmidos que contenían un gen indicador para una proteína fluorescente verde (*gfp*) mutada, y dichos plásmidos expresaron un mutante de plegamiento rápido de la proteína fluorescente verde *Aequorea victoria* bajo el control transcripcional del promotor *araB*. Un examen microscópico de las células cultivadas con concentraciones bajas de arabinosa mostró una mezcla de células fluorescentes de forma brillante y células oscuras, lo cual sugiere que los niveles de expresión intermedios en cultivos son el reflejo de una población media. Como el inductor arabinosa se transporta activamente a la célula, se esperaría que la cantidad de inducción en cualquier célula determinada variaría con la cantidad de arabinosa transportada activamente a esta célula. De este modo, la cantidad media de inducción en una población de células representaría, a su vez, la cantidad media de arabinosa transportada activamente hacia esa población de células. No obstante, resulta importante observar que aquellas células que sí contienen concentraciones elevadas de arabinosa se inducen totalmente. Se tiene también conocimiento de un fenómeno similar con el transporte de lactosa y la inducción del operón *lac* (Novick y Weiner, 1957, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 553 y Maloney y Rotman, 1973, *J. Mol. Biol.* 73: 71-91). De este modo, dichas referencias, incluyendo las de Siegel y Hu, *supra*, concluyen que aunque los vectores *araB* tienen las ventajas de una regulación rápida y una expresión de nivel basal bajo en comparación con los plásmidos regulados por el represor *lac*, el promotor *araB* no resulta adecuado de forma satisfactoria para modular la expresión de genes clonados debido a las variaciones en la absorción de arabinosa entre células.

Las referencias antes citadas indican que el sistema de expresión con *araB* resulta útil para la expresión controlada de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos. Estas referencias indican además que el sistema con *araB* ofrece ventajas que no se encuentran en otros sistemas de expresión bacterianos. No obstante, uno de los problemas que sigue afrontando la técnica es la generación de cultivos celulares regulados directamente en los cuales la cantidad de expresión proteica en las células sea realmente proporcional a la cantidad del inductor (por ejemplo, arabinosa) presente en el medio de cultivo. Como la inducción de productos recombinantes en células bacterianas pueden inhibir con frecuencia el crecimiento celular subsiguiente, sería deseable generar cultivos celulares en los cuales la expresión génica se pudiera regular directamente y de forma proporcional mediante la cantidad de inductor presente.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a métodos mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes, incluyendo péptidos y polipéptidos, bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*. En relación con esto, se modifican genéticamente células huésped bacterianas con deficiencias en el(los) sistema(s) de transporte activo para un inductor de un promotor y las mismas contienen vectores para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control de transcripcional de un promotor inducible. La presente invención se refiere específicamente a células huésped bacterianas novedosas modificadas genéticamente, que son deficientes genéticamente en uno o ambos de los dos sistemas de transporte de L-arabinosa conocidos en *E. coli* y bacterias relacionadas de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo especies de *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Enterobacter*, y que son capaces de expresar productos proteicos recombinantes. El uso de dichas células huésped bacterianas deficientes en el transporte, incluyendo células huésped bacterianas deficientes en el transporte de arabinosa, para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control transcripcional de un promotor inducible tal como el promotor *araB* proporciona, para una expresión aumentada del producto proteico recombinante, una menor inhibición del crecimiento de las células huésped después de la inducción, y/o una inducción directa y sincronizada de la expresión en dichas células huésped en comparación con la correspondiente a las células con una capacidad elevada de transporte. De este modo, según los métodos de la presente invención, se producen de manera eficaz y económica productos proteicos recombinantes, incluyendo productos proteicos útiles como agentes terapéuticos, profilácticos y/o diagnósticos.

En el presente documento se da a conocer un método para producir un producto proteico recombinante bajo el control inducible de un promotor inducible, tal como un promotor *araB*, que comprende: (a) se introduce un vector de expresión recombinante que codifica un producto proteico recombinante bajo el control de un promotor inducible (por ejemplo, *araB*) en una célula huésped bacteriana que es genéticamente deficiente en por lo menos un sistema

para el transporte activo del inductor (por ejemplo, arabinosa) hacia la célula huésped; y (b) se induce la expresión del producto proteico recombinante con el inductor (por ejemplo, arabinosa).

Tal como se da a conocer en el presente documento, un método mejorado proporciona una regulación directa, incluyendo una inducción sincronizada, de cultivos celulares bacterianos, en los cuales la expresión del producto proteico recombinante es proporcional a la concentración del inductor (por ejemplo, arabinosa) en el cultivo. En células huésped modificadas genéticamente que contienen un vector para la expresión del producto proteico bajo el control transcripcional del promotor inducible (por ejemplo, *araB*) y que son deficientes en el transporte del inductor (por ejemplo, arabinosa), la concentración intracelular del inductor (por ejemplo, arabinosa) es proporcional a la concentración del inductor (por ejemplo, arabinosa) en el medio de cultivo ya que la difusión pasiva es el único mecanismo para la acumulación intracelular del inductor (por ejemplo, arabinosa) a través de las membranas bacterianas. Esto constituye una regulación directa de la expresión y deriva en una inducción sincronizada de la expresión del producto proteico recombinante en las células huésped. De este modo, los métodos de la presente invención ofrecen ventajas que no se encuentran con la expresión en huéspedes bacterianos con una capacidad elevada de transporte a partir de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*, en los que existe una población mixta de células inducidas y no inducidas, y en los que la relación aparente entre la cantidad de producto recombinante y la concentración de agente de inducción a cantidades subsaturantes del inductor, tal como la arabinosa, es un reflejo del valor medio de la expresión en la población en células tanto inducidas como no inducidas.

En el presente documento también se da a conocer una célula huésped bacteriana que es deficiente en uno o más de los sistemas de transporte activo para un inductor, tal como la L-arabinosa, y que contiene un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*. Dichas células son útiles para la producción de una variedad de productos proteicos.

Según la presente invención, se proporciona un método para producir un producto proteico recombinante bajo el control de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es un promotor *araB*, que comprende: (a) se introduce un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible, en una célula huésped bacteriana que es genéticamente deficiente en un sistema para el transporte activo de un inductor de arabinosa del promotor hacia la célula huésped, en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*; y (b) se induce la expresión del producto con el inductor.

Según la presente invención, se proporciona además un método para producir un producto proteico recombinante bajo el control de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es un promotor *araB*, que comprende: (a) se cultiva una célula huésped bacteriana que es genéticamente deficiente en un sistema para el transporte activo de un inductor de arabinosa del promotor inducible hacia la célula huésped, en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*, y en el que la célula huésped contiene un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible; y (b) se induce la expresión del producto con el inductor.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped bacteriana que es deficiente en un sistema de transporte activo para un inductor de arabinosa de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es un promotor *araB*, y en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*, en la que la célula huésped contiene un vector de expresión recombinante que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible.

Los productos proteicos recombinantes pueden ser agentes terapéuticos, profilácticos y/o diagnósticos. Dichos productos recombinantes pueden incluir productos proteicos, preferentemente productos derivados de animales y vegetales, que no sean productos de genes indicadores o marcadores, incluyendo productos de genes de mamíferos tales como productos proteicos humanos o de tipo humano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un gel de poliacrilamida teñido con plata que compara el patrón proteico después de la inducción de transformantes de E220 (pING3825), E226 (pING3825) y E229 (pING3825) tras una inducción con arabinosa al 0,01 y al 1,0% durante 4, 5 horas.

La Figura 2 muestra geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie coloidal que comparan los sobrenadantes de cultivos libres de células a partir de células huésped bacterianas inducidas con arabinosa. La Figura 2A muestra la inducción después de 4 horas; la Figura 2B muestra la inducción después de 18 horas.

La Figura 3 muestra un *Western blot* de muestras inducidas y no inducidas que comparan los sobrenadantes de cultivos libres de células a partir de células huésped bacterianas inducidas con arabinosa.

La Figura 4 muestra un esquema del sistema promotor *araB* (ver también, Better *et al*, 1999 *supra*).

Descripción detallada de la invención

Los métodos de la presente invención se basan en el descubrimiento sorprendente de que el nivel de expresión de productos proteicos recombinantes expresados bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*, puede ser mayor en células bacterianas que sean deficientes en por lo menos un sistema de transporte activo para el inductor del promotor, tal como en uno o en ambos de los sistemas de transporte de arabinosa de *E. coli*. Además, sorprendentemente, se logran reducciones sustanciales de la inhibición del crecimiento celular bacteriano de dichas células huésped deficientes en el transporte en comparación con el correspondiente a las células con una capacidad elevada de transporte. Por ejemplo, con la arabinosa, se pueden observar dichas reducciones de la inhibición del crecimiento debida a la arabinosa usando concentraciones de arabinosa entre aproximadamente 10 y 100 veces mayores con dichas células deficientes en el transporte, presentando la expresión proteica recombinante aproximadamente el mismo nivel o mayor. Adicionalmente, en dichas células huésped se demostró sorprendentemente una regulación directa y una inducción sincronizada de la expresión proteica recombinante con un inductor tal como arabinosa. La presente invención se refiere en general a métodos mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*, en células huésped bacterianas que son deficientes en uno o más de los sistemas de transporte activo para un inductor, tal como la L-arabinosa, con lo cual la expresión génica bajo el control del promotor inducible se puede regular directamente mediante la concentración del inductor, tal como la arabinosa, presente en el medio de cultivo. Las concentraciones de arabinosa útiles para inducir células huésped se incluyen entre aproximadamente el 0,00001% y aproximadamente el 10% (v/v). La presente invención se refiere también en general a células huésped bacterianas que son deficientes en uno o más de los sistemas de transporte activo para un inductor de un promotor, tal como la L-arabinosa, que contienen un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*. Una célula huésped bacteriana de este tipo, según la invención, proporciona una expresión aumentada de un producto proteico recombinante.

De este modo la presente invención proporciona métodos mejorados para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor *araB*, en células huésped bacterianas que son deficientes en uno o más de los sistemas de transporte activo para un inductor, tal como la L-arabinosa. La expresión génica bajo el control de un promotor inducible (por ejemplo, *araB*) de este tipo se puede regular directamente mediante la concentración de inductor (por ejemplo, arabinosa) presente en el medio de cultivo. En particular, el método proporciona específicamente el desarrollo y uso de células huésped bacterianas que contienen vectores de expresión que codifican productos proteicos recombinantes, en los que las células son genéticamente deficientes en uno o ambos de los dos sistemas de transporte de L-arabinosa conocidos en *E. coli* o sistemas de transporte de arabinosa similares en cualquiera de las bacterias relacionadas de la familia *Enterobacteriaceae*. El uso de cepas deficientes en el transporte de arabinosa para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control transcripcional del promotor *araB* proporcionó un aumento de la expresión del producto recombinante y/o una menor inhibición del crecimiento de las células huésped después de la inducción en comparación con los niveles de expresión en células con una elevada capacidad de transporte de arabinosa. De este modo, el método de la invención resulta útil para aumentar el rendimiento de células y/o producto proteico recombinante a partir de células huésped bacterianas inducidas. El método mejorado proporciona también unos medios para regular directamente la cantidad de producto proteico recombinante en una célula huésped mediante el control de la cantidad del agente inductor, tal como la L-arabinosa, que se introduce en el cultivo bacteriano.

El término “vector” hace referencia a ADN plásmido o viral que contiene material genético recombinante el cual codifica un(os) producto(s) proteico(s) recombinante(s) y que puede tener la capacidad de replicación autónoma en bacterias. El término vector se refiere también en el presente documento como “vector de expresión recombinante” o “vector de expresión”.

El término “transformación” o “transformado” hace referencia a una introducción de material genético recombinante tal como un vector (por ejemplo, plásmido) en una célula bacteriana a través de cualquier método de transformación conocido en la técnica. A una célula bacteriana o a aquellas colonias resultantes de una célula bacteriana que han recibido dicho material genético recombinante se les hace referencia como “transformantes”.

El término “transducción” o “transducido” hace referencia a la introducción de material genético en un huésped bacteriano a partir del material genético de un bacteriófago a través de cualquier método de transducción conocido en la técnica. A una célula bacteriana o a aquellas colonias resultantes de una célula bacteriana que han recibido dicho segmento de material genético desde un bacteriófago se les hace referencia como “transductoras”.

La expresión “genéticamente deficiente” hace referencia a una carencia o deficiencia de un producto génico por mutación del ADN, incluyendo sustitución, supresión y/o adición.

La expresión “producto proteico recombinante” hace referencia a cualquier producto proteico que no sea un producto de genes indicadores o marcadores (tal como una proteína fluorescente verde) expresado a partir de material genético recombinante que codifica aminoácidos, incluyendo péptidos, polipéptidos, proteínas, oligoproteínas y/o proteínas de fusión. Un producto proteico recombinante es preferente un producto derivado de animales o vegetales que no sea un producto de genes indicadores o marcadores tal como una proteína fluorescente verde. Uno de los productos proteicos recombinantes es preferentemente un producto recombinante derivado de mamíferos o vegetales. Uno de los productos proteicos recombinantes es también preferentemente un producto proteico humano de tipo humano.

Uno de los productos proteicos recombinantes es preferentemente un producto terapéutico, profiláctico o diagnóstico. La expresión “producto de genes indicadores” o “productos de genes marcadores” hace referencia a herramientas de investigación que son productos proteicos fácilmente detectables que se usan comúnmente para estudiar si se ha producido una expresión génica (es decir, actúan como indicadores o marcadores de su expresión). Entre los productos de genes indicadores o marcadores representativos se incluyen la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), el inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI), la B-lactamasa (B-lac), la B-galactosidasa (B-gel) y varias formas de la proteína fluorescente verde (gfp).

La proteína “gelonina” hace referencia a la proteína inactivadora de ribosomas gelonina, expresada en el presente documento como un producto recombinante bajo el control transcripcional del promotor *araB*. La proteína recombinante gelonina se clonó a partir de la semilla de la planta *Gelonium multiflorum* según se describe en la publicación de Nolan *et al.*, 1993, *Gene* 134: 223-227, y según se describe en las patentes U.S. de propiedad compartida Nos. 5.376.546 y 5.837.491. La gelonina se expresó como una proteína secretada en *E. coli* usando la secuencia líder *pelB*, describiéndose dicha secuencia líder en las patentes U.S. de propiedad compartida No. 5.576.195 y 5.846.818.

El producto proteico recombinante de gelonina expresado según la invención es un producto proteico recombinante ilustrativo expresado en una célula huésped bacteriana ilustrativa (*E. coli*) bajo el control transcripcional de un promotor inducible ilustrativo (el promotor *araB*). Los productos proteicos recombinantes expresados de la invención pueden incluir cualquier secuencia de aminoácidos conocida en la técnica para aquellos productos proteicos recombinantes que no sean un producto de genes indicadores o marcadores tal como una proteína fluorescente verde bajo el control transcripcional de un promotor inducible, preferentemente el promotor *araB*. La invención proporciona productos proteicos recombinantes que se acumulan en cualquier compartimento bacteriano o son secretados hacia el sobrenadante del cultivo libre de células después de la inducción de promotor inducible (por ejemplo, *araB*). De este modo, la invención se refiere a aquellos productos proteicos recombinantes que permanecen asociados con las células huésped bacterianas después de la inducción bien en el periplasma o bien en el citoplasma, o a aquellos que son secretados hacia el medio de cultivo.

El promotor *araB* útil según la invención es un promotor inducible ilustrativo. Uno de los inductores de este promotor inducible es la arabinosa, un azúcar de cinco carbonos que se encuentra ampliamente en la naturaleza y que puede actuar como una fuente única de carbono en muchas bacterias para el crecimiento. Este sistema promotor inducible se revisa en el documento de Better *et al.*, 1999, *supra*. Para la degradación de la arabinosa en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *E. coli* y *S. typhimurium*, son necesarios los productos proteicos de tres genes (*araB*, *araA*, y *araD*), y estos genes forman una agrupación abreviada como *araBAD*. Estos genes están dispuestos en un único operón y codifican las enzimas ribulokinasa (AraB), L-arabinosa isomerasa (AraA) y L-ribulosa-5-fosfato-4 epimerasa (AraD). Adyacente al operón *araBAD* hay una región promotora compleja y el gen regulador *araC*. Los genes *araBAD* y *araC* se transcriben en direcciones opuestas. En los promotores y alrededor de los mismos para el *araBAD* (P_{BAD}) y *araC* (P_C) se encuentran sitios de unión para la proteína AraC, la proteína receptora de AMP cíclico (CRP), y la ARN polimerasa. Solas o combinadas, las proteínas unidas a estas regiones tanto en presencia como en ausencia del inductor, L-arabinosa, regulan de forma ajustada la expresión de ambos promotores. La Figura 4 ilustra la disposición espacial de sitios reguladores en esta región promotora compleja *araBAD* y *araC*.

La transcripción del P_{BAD} es inducible con L-arabinosa. En presencia de arabinosa, la proteína AraC unida en el sitio *araI* inmediatamente adyacente al sitio de unión de la ARN polimerasa del promotor P_{BAD} estimula la transcripción del operón *araBAD*. No obstante, en ausencia de arabinosa, la proteína AraC reprime la síntesis de ARNm a partir del P_{BAD} mediante un mecanismo que implica la formación de un bucle de ADN. Sin la arabinosa, la mayoría de copias de la región reguladora *ara* contienen un bucle de ADN entre los sitios *araO*₂ y *araI* mediados por la proteína AraC unida a ambos sitios mencionados. Este bucle impide que la proteína AraC unida en *araI* entre en el estado de inducción, y mantiene el nivel no inducido de la expresión del P_{BAD} a un valor bajo. Tras la adición de la arabinosa, el bucle *araO*₂-*araI* se abre, y la arabinosa unida a la proteína AraC en el sitio *araI* impulsa a la AraC a la conformación de inducción, induciendo de este modo el P_{BAD} . La regulación de este operón está sujeta también a la represión catabólica, por lo que incluso en presencia de arabinosa, se produce una inducción significativamente menor cuando los niveles del AMP cíclico intracelular (cAMP) son bajos, tal como cuando las células se cultivan en presencia de glucosa.

La transcripción del P_C está regulada también por la arabinosa. En ausencia de arabinosa, el acceso de la ANR polimerasa al P_C está limitado por la formación del bucle *araI-araO*₃ mediado por AraC, y la expresión de *araC* permanece a un nivel bajo. En presencia de arabinosa, la AraC unida al *araI* en su conformación de inducción libera la limitación estérica y la ANR polimerasa presenta un acceso aumentado al P_C . No obstante, la actividad transcripcional del P_C es transitoria, ya que la AraC se puede unir a *araO*₁ y entre el *araO*₁ y el *araO*₂ se forman bucles de ADN mediados por la AraC que finalmente limitan la transcripción del P_C . Adicionalmente, el P_C está también sujeto a la represión catabólica.

Aunque aparentemente complejas, estas disposiciones reguladoras permiten que las bacterias produzcan enzimas para el metabolismo de la arabinosa únicamente cuando son necesarias. El sistema ha evolucionado de manera que incluye dos proteínas reguladoras positivas (AraC + arabinosa; CRP), un elemento regulador negativo (AraC - arabinosa), un mecanismo para controlar la expresión génica a través de bucles de ADN, y un sistema que puede evitar o mejorar una interacción con la ARN polimerasa. Todas las características de esta región reguladora completa están contenidas adecuadamente en aproximadamente 300 pares de bases de ADN tal como se muestra en la Figura 4.

De este modo, un “promotor *araB*” hace referencia a una región de control de ADN que contiene por lo menos un sitio de unión para una ARN polimerasa y un(os) sitio(s) de unión asociado(s) para la proteína AraC o su equivalente funcional. En el ADN correspondiente a la región aproximadamente +1 a -100 del promotor, según se representa esquemáticamente en la Figura 4, se encuentran elementos de control esenciales de un promotor *araB* de la familia *Enterobacteriaceae* ejemplificada por la de *E. coli*. En el ADN correspondiente a la región aproximadamente -100 a -300 del promotor, también tal como se representa esquemáticamente en la Figura 4, se encuentran elementos de control adicionales preferidos tales como un(os) sitio(s) de unión adicional(es) para la araC o su equivalente funcional (por ejemplo, AraO₂). De la forma más preferente, un promotor *araB* hace referencia a la región de control de ADN correspondiente a la región aproximadamente +1 a -300 del promotor según se representa esquemáticamente en la Figura 4.

Las células huésped bacterianas de la invención se pueden propagar por cualquier método conocido en la técnica incluyendo aunque sin limitaciones, crecimiento en tubos de cultivo, matraces de agitación o fermentadores bacterianos. Una de las realizaciones preferidas de la invención es la propagación de células huésped que contienen un vector de expresión recombinante en un fermentador según se describe en la patente U.S. de propiedad compartida No. 5.851.802 y la solicitud de patente U.S. No. 09/271.970, o por otros medios conocidos en la técnica.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán al considerar los siguientes ejemplos ilustrativos en los que el Ejemplo 1 trata sobre la construcción de cepas isogénicas novedosas deficientes en el transporte de arabinosa que se transforman en el Ejemplo 2 con un vector que codifica un producto proteico recombinante. El Ejemplo 2 trata sobre el análisis de la expresión de un producto proteico recombinante ilustrativo, la gelonina, en W3110, E220, E224 y E226 después de una inducción con arabinosa mediante una SDS-PAGE y un ELISA. El Ejemplo 3 trata sobre el análisis del crecimiento celular y la expresión del producto proteico de gelonina en E104, E221, E225 y E227 después de una inducción con arabinosa.

Ejemplo 1

Construcción de Cepas Deficientes en el Transporte de Arabinosa

Se construyeron cepas isogénicas $\Delta araFGH::kan$ y *araE201* a partir de *E. coli* W3110 (ATCC 27325) y *E. coli* E104 (depositada como ATCC 69009; ATCC 69008; ATCC 69101; ATCC 69102; ATCC 69103; ATCC 69104; ATCC 69331; ATCC 69332; ATCC 69333, conteniendo cada una de ellas un plásmido codificante de gelonina). En la Tabla 1 se muestran las cepas resultantes junto con cepas intermedias.

TABLA 1

Cepas con Alta Capacidad de Transporte de Arabinosa y Deficientes en dicho Transporte

Cepa	Progenitora o referencia	Genotipo relevante
CW2553	Horazdovsky and Hogg. Jour. Of Bacter. 171: 3053-3059	$\Delta araFGH::kan$ <i>araE201</i>
E104	W3110/ Ver Ejemplo 1	$\Delta(araBC)768$
W3110	ATCC. 27325	
E220	W3110/PTA-1524 ^A	$\Delta araFGH::kan$
E221	E104/PTA-1525 ^A	$\Delta araFGH::kan$
E222	W3310	<i>thyA</i>
E223	E104	<i>thyA</i>
E224	E222/PTA-1526 ^A	<i>araE201</i>
E225	E223/PTA-1527 ^A	<i>araE201</i>
E226	E224/E228/PTA-1528 ^A	$\Delta araFGH::kan$ <i>araE201</i>
E227	E229/PTA-1529 ^A	$\Delta araFGH::kan$ <i>araE201</i>
E228	E220	$\Delta araFGH::kan$ <i>thyA</i>
E229	E221	$\Delta araFGH::kan$ <i>thyA</i>

^A Depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 21 de marzo de 2.000.

Construcción de E220 y E221

La E220 y E221 se construyeron mediante transducción con P1 de W3110 y E104, respectivamente, con el bacteriófago P1vir cultivado en *E. coli* CW2553 (Horazdovsky y Hogg, *supra*). Para la preparación del cultivo madre del fago P1 en *E. coli* CW2553, se inocularon células bacterianas en un medio TYE (triptona 15 g/L, extracto de levadura 10 g/L, y NaCl 5 g/L) y las mismas se cultivaron durante 6 horas. Las células se diluyeron a 1:50 en TYE complementado con CaCl₂ 5 mM y se cultivaron durante unos 90 minutos adicionales. Un cultivo madre del fago P1vir se diluyó a 1:1.000 en una disolución salina mínima (por litro: 21,4 g K₂HPO₄, 10,4 g KH₂PO₄, 13,6 g (NH₄)₂SO₄ y 0,3 g MgSO₄·7 H₂O), y 0,1 mL del fago se mezclaron con 0,2 mL de células. El fago y las células se incubaron a 37°C durante 20 minutos sin agitación, a continuación se añadieron 3 mL de agar blando R (Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, 1992) y la mezcla se colocó en placas sobre agar R y se cultivó durante la noche. A la parte superior de la placa se le añadieron tres mL de TYE, y la mezcla de TYE y agar blando se extrajo por raspado de la superficie de la placa. Se añadieron tres gotas de cloroformo, la mezcla se sometió a agitación vorticial y el cultivo madre del fago se separó del agar mediante centrifugación. El título del cultivo madre resultante del fago fue aproximadamente 4 x 10⁹ fago/mL.

Para la transducción de W3110 y E104, cada una de las cepas se cultivó durante la noche en TYE + 5 mM CaCl₂. Las células en dos mL de cada uno de los cultivos se recogieron mediante centrifugación, se suspendieron en 2 mL de MgSO₄ 0,1 M, CaCl₂ 0,005 mM, y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Las células (0,3 mL) y 0,2 mL de TYE + CaCl₂ 5 mM se mezclaron con 0,1 mL de fago sin diluir, fago que se había diluido a 1:10 ó 1:100, o únicamente tampón de dilución. Las células y el fago se incubaron durante 20 minutos a 37°C, a continuación se añadieron 0,6 mL de citrato de sodio 1 M seguido por 6 mL de TYE. Los transductores se cultivaron durante 4 horas a 37°C antes de colocarlos en placas de TYE complementado con kanomicina (50 mg/L). En las placas aparecieron colonias con fago que se había diluido a 1:10 y 1:100. En las placas de control no aparecieron colonias. Un transductor resistente a la kanomicina, de W3110 se seleccionó como E220, y un transductor resistente a la kanomicina, de E104, se seleccionó como E221.

Construcción de E222, E223, E228 y E229

Como el alelo de *araE201* se puede co-transducir con el gen *thyA*, derivados *thyA* de W3110, E104, E220 y E221 se identificaron mediante selección en placas de trimetoprim (Miller, *supra*). Se prepararon placas de trimetoprim con glucosa mínima con trimetoprim 10 mg/L, y cada una de las cepas se colocó en placas. Unas pequeñas colonias que aparecieron después de aproximadamente 4 días se volvieron a estriar sobre placas de trimetoprim y se seleccionaron colonias individuales. A continuación, estas colonias individuales se volvieron a estriar sobre placas mínimas, placas mínimas complementadas con timidina y placas de trimetoprim. De este modo, se identificó un derivado *thyA* de cada una de las cepas tal como se indica en la Tabla 1.

Construcción de E224

Se transdujo *E. coli* E222 a ThyA⁺ con P1vir cultivado en CW2553. Se cultivaron células por la noche en TYE+ CaCl₂ 5 mM, las mismas se suspendieron en MgSO₄ 0,1 M, CaCl₂ 0,005 M y se incubaron con diluciones seriadas de fago en 0,6 mL. Las células y el fago se incubaron durante 20 minutos a 37°C seguidas por la adición de 0,6 mL de citrato de sodio 1 M y 6 mL de TYE. Los transductores se cultivaron durante 1 hora a 37°C, a continuación se recogieron mediante centrifugación y se suspendieron en 1 mL de una disolución salina (por litro: K₂HPO₄ 21,4 g, KH₂PO₄ 10,4 g, (NH₄)₂SO₄ 13,6 g y MgSO₄·7 H₂O 0,3 g). Se colocaron células sobre placas con glucosa mínima y las mismas se cultivaron a 37°C. Diez transductores candidatos se volvieron a estriar sobre placas mínimas. Las colonias que aparecieron de las nuevas estrias se sometieron a pruebas en relación con su fenotipo de placas de arabinosa tetrazolio. La E222 resultó blanca sobre placas de arabinosa tetrazolio (Ara⁺) mientras que siete de diez transductores resultaron de color rosa. Las cepas de Ara⁻ son rojas sobre placas de tetrazolio. Como E224 se seleccionó una colonia rosa. Estos datos demuestran que las cepas de *araE201* presentan un fenotipo parcialmente Ara⁻. Esta diferenciación fenotípica también se pudo observar sobre placas MacConkey complementadas con arabinosa 0,25%, en las cuales se cultivó E224 en forma de colonias de color rosa pálido.

Construcción de E226

Se construyó una cepa bacteriana que era *araE201* y Δ *araFGH* a partir de cada una de las cepas productoras de E224 y E228 con genotipos idénticos. La E224 se transdujo para presentar resistencia a la kanomicina con un lisado de P1vir a partir de CW2553, y como E226 se seleccionó un único transductor. De forma similar, la E228 se transdujo a ThyA⁺ con un lisado de P1vir a partir de CW2553. A partir de los dos transductores ThyA⁺ de E228, un clon candidato tenía el fenotipo parcial Ara⁻, es decir, colonias rosas sobre placas de arabinosa tetrazolio. Este candidato también se seleccionó como E226. La cepa E226 preparada a partir bien de E224 ó bien de E228 tenía un genotipo idéntico y presentaba el mismo fenotipo sobre placas de tetrazolio arabinosa.

Construcción de E227

Aunque se pudo seleccionar un derivado *araE201* de E222 ó E228 entre transductores ThyA⁺ mediante selección genotípica en placas indicadoras, este planteamiento no se pudo usar para la selección de un derivado *araE201* de cepas que evolucionaron a partir de la E104 debido a que la cepa ya es Ara⁻ por causa de una supresión de la región *araBC*,

$\Delta(araBC)768$. Por esta razón, fue necesario un planteamiento diferente para seleccionar este mutante de transporte de arabinosa en una arabinosa sin el fondo. Con este fin, la E229 se transformó con el plásmido pING3825, el cual codifica la proteína gelonina bajo el control inducible del promotor *araB*, y se seleccionaron colonias resistentes a la tetraciclina. A continuación, la E229 (pING3825) se transdujo a *ThyA*⁺ con P1vir propagado sobre CW2553, y se seleccionaron transductores sobre placas con glucosa mínima complementadas con tetraciclina. Los transductores *ThyA*⁻ junto con E220 (pING3825) y E226 (pING3825) se inocularon en TYE + tetraciclina y se cultivaron durante la noche. A continuación, los transductores y los controles se diluyeron en 10 mL del medio y se cultivaron durante aproximadamente dos horas a una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Tres mL de cada cultivo se extrajeron hacia un tubo que contenía bien 0,15 mL de arabinosa 0,2% ó bien 0,15 mL de arabinosa 20% hasta una concentración final de arabinosa de, respectivamente, el 0,1 ó el 1%. Cada cultivo se cultivó durante 4,5 horas, y las células se extrajeron mediante centrifugación. Mediante la SDS-PAGE se evaluaron quince microlitros del sobrenadante de cultivo libre de células de cinco transductores y los controles E220 y E226. El gel se tiñó con azul Coomassie coloidal, se fotografió y a continuación se tiñó con plata, Figura 1. Dos de los dos transductores produjeron muy poca gelonina recombinante después de una inducción de cuatro horas con arabinosa 0,01% tal como ocurrió con el control E226, mientras que los otros tres produjeron aproximadamente tanta gelonina como el control E220. En los cultivos inducidos con arabinosa 1,0%, no se detectaron diferencias entre los niveles de expresión de los transductores. Las células usadas para generar la muestra de la Figura 1, calle 3, se seleccionaron como *E. coli* E227 (pING3825). Para seleccionar una cepa que hubiera perdido el plásmido, se hizo crecer un cultivo de E227 (pING3825) durante 3 días en TYE a 37°C, y el mismo a continuación se colocó sobre placas TYE para aislar las colonias individuales. Se recogieron colonias sobre placas con y sin tetraciclina, y se identificó una colonia que había perdido el plásmido. Esta cepa se designó como E227.

Construcción de E225

La *E. coli* E223 se transformó con el plásmido pING3825, y se seleccionaron colonias que contenían el plásmido sobre placas que contenían tetraciclina. La E223 (pING3825) se transdujo con P1vir cultivado en CW2553 y se seleccionaron transductores capaces de ser cultivados sobre placas mínimas. Se seleccionaron colonias individuales para la producción de gelonina después de una inducción con arabinosa 0,01% tal como se ha establecido anteriormente para la selección de la E227. Como E225 (pING3825) se seleccionó una línea celular que produjo únicamente una pequeña cantidad de gelonina en comparación con la E220 (pING3825) y la E104 (pING3825) y una cantidad similar a la E227 (pING3825). Para identificar una línea celular que hubiera perdido el plásmido pING3825, se cultivó E227 (pING3825) durante 24 horas a 37°C, y a continuación la misma se expuso a temperatura ambiente durante tres días. A continuación, las células viables del cultivo se colocaron sobre placas en el medio TYE y seguidamente las colonias resultantes se recogieron sobre placas con y sin tetraciclina, y se identificó una colonia que había perdido el plásmido. Esta cepa se designó como E225.

Ejemplo 2

Análisis SDS-PAGE y ELISA de la Expresión de Gelonina en W3110, E220, E224 y E226 después de una Inducción con Arabinosa

Se transformaron cuatro cepas isogénicas (W3110, E220, E224 y E226) con pING3825. Cada línea celular se cultivó a una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,4, y a continuación alícuotas de 2 mL de cada uno de los cultivos se transfirieron a tubos complementados con arabinosa al 0, 0,01, 0,1 ó 1%. Se obtuvieron veintiocho tubos, de manera que se pudieran recolectar células inducidas con arabinosa 0, 0,01, 0,1 ó 1% a las 4 horas postinducción y se pudieran recolectar células inducidas con arabinosa 0,01, 0,1 y 1% a las 18 horas postinducción. Después del periodo de inducción adecuado bien de 4 ó bien de 18 horas, las células se extrajeron del sobrenadante del cultivo mediante centrifugación y cada uno de los sobrenadantes se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m antes de almacenarlo a 4°C. Se evaluaron diez microlitros de cada uno de los sobrenadantes mediante una electrofóresis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Muestras de cada uno de los sobrenadantes se tiñeron con azul Coomassie coloidal, Figura 2. Algunas muestras se transfirieron también a una membrana PVDF y se detectaron con anticuerpos de conejo en relación con la presencia de gelonina seguido por un conjugado con peroxidasa, de cabra, anticonejo, Figura 3. Después de una inducción con arabinosa 0,01% durante 4 horas, la expresión de la gelonina era detectable (banda tenue) en W3110 y E220 mediante el azul Coomassie coloidal, Figura 2A, calles 1 y 2, y la gelonina era fácilmente detectable mediante un análisis Western blot en la E220, aunque no se pudo detectar ninguna en las muestras de E224 ó E226 a las 4 horas mediante ninguna de las técnicas. A las 4 horas postinducción con arabinosa 0,1%, no se pudieron detectar diferencias en la cantidad de expresión de gelonina en ninguna de las muestras, en las que estaba claramente presente una banda del tamaño esperado para la gelonina, Figura 2A, calles 5 a 8 y Figura 3, calles 7 a 9. No obstante, a las 4 horas postinducción con arabinosa 1%, en las cepas E224 y E226 se produjo una expresión más evidente que en las muestras de la cepa bien W3110 ó bien E220, Figura 2A, calles 9 a 12, y Figura 3, calles 10 a 12.

En las muestras de la inducción de 18 horas, no se produjo ninguna diferencia aparente en la cantidad de gelonina presente en cualquiera de las cuatro muestras inducidas con arabinosa 0,01%, Figura 2B, calles 1 a 4. Por contraposición, en las muestras de E224 y E226 inducidas con arabinosa bien 0,1 ó bien 1,0% había mucha más gelonina que en las muestras de W3110 ó E220. La expresión mejorada de la gelonina en la arabinosa 1,0% a las 4 horas y arabinosa 0,1, Figura 2B, calles 5 a 8 (comparar calles 7, 8 con calles 5, 6), ó 1,0%, Figura 2B, calles 9 a 12 (comparar calles 11, 12, con calle 9, 10), a las 18 horas en la E224 y en la E226 demuestra la ventaja de la expresión génica recombinante en células huésped bacterianas deficientes en el transporte. En los cultivos E224 y E226 resultó evidente una menor inhibición del crecimiento bacteriano después de la inducción con arabinosa, y esto probablemente dio como

resultado una mayor acumulación celular de proteínas recombinantes. De este modo, un número mayor de células en las muestras resultantes dio como resultado una mayor expresión de gelonina en el cultivo. Estos datos demuestran que se requiere un sistema de transporte de AraE intacto para una inducción de nivel bajo de una proteína recombinante a partir de un plásmido con un número moderado de copias por arabinosa 0,01% antes de 4 horas, mientras que la expresión a 18 horas es idéntica en las cepas tanto *araE* como *araE*⁺. Estos datos muestran también que las células deficientes en AraF inducen el producto recombinante de forma similar a la cepa de tipo salvaje bajo todas las condiciones experimentales de las pruebas.

Las mismas muestras que se evaluaron mediante la SDS-PAGE se evaluaron también mediante un ensayo ELISA. Se recubrieron pocillos con anticuerpos de conejo anti gelonina antes de la adición de las muestras inducidas. La gelonina unida en cada uno de los pocillos se detectó con anticuerpos biotinilados de conejo antigelonina, y la biotina en cada uno de los pocillos se detectó con un conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano. La Tabla 2 muestra los resultados de este primer ensayo ELISA.

TABLA 2

Gelonina detectada mediante ELISA después de 4 horas de inducción (ng/ml)

Cepa	Arabinosa	Concentración	
	0,01%	0,1%	1,0%
W3110	44,7	101	165
E220	42	81	124
E224	3,6	254	121
E226	2,6	141	219

La E220 y la W3110 responden de forma similar a la inducción con arabinosa, mientras que las cepas *araE201* y *araE201 ΔaraFGH*, E224 y E226, respectivamente, producen mucha menos gelonina con arabinosa 0,01% aunque aproximadamente tanta o más gelonina con arabinosa 0,1% y 1,0%. Los datos del ELISA demuestran también que la cepa *araF*⁻ E220 produce ligeramente menos proteína recombinante de la que produce la W2110.

En un experimento aparte, se evaluaron temporalmente *E. coli* E220 y E226 en relación con la expresión de gelonina después de una inducción con arabinosa 0,01% y 1,0%. Después de una inducción con una concentración de arabinosa bien del 0,1% ó bien del 1,0%, se extrajeron muestras a las 1,25, 3 y 4,5 horas después de la inducción, y la cantidad de gelonina que apareció en el sobrenadante del cultivo libre de células se evaluó mediante el ELISA. Los datos de este experimento se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Gelonina detectada mediante ELISA después de inducción con arabinosa (ng/mL)

Tiempo después de la inducción	0,01 % arabinosa		1,0% arabinose	
	E220	E226	E220	E226
1,25 horas	<1,05	<1,05	2,6	4,8
3,0 horas	8,6	1,4	35,6	131
4,5 horas	9,5	2,1	126	156

† - el límite de detección en este ensayo fue 1,05 ng/mL

Estos datos demuestran además que, con la concentración de arabinosa baja (0,01%), la E226 es menos inducible que la E220. No obstante, después de una inducción con la concentración de arabinosa más alta, la E226 acumula más producto que la E220. Estos datos demuestran también que la E226 acumula gelonina más rápidamente de lo que lo hace la E220. Las muestras descritas en la Tabla 3 se evaluaron también mediante un Western blotting. Las muestras se separaron mediante una SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF. Se detectó la cantidad de gelonina en cada calle con anticuerpos de conejo antigelonina seguidos por un conjugado de peroxidasa con anticonejo caprino. Los datos del Western confirmaron los datos del ELISA con la arabinosa 0,01% mostrando que sin arabinosa, en la E226 no se producía ninguna inducción o una inducción muy baja de gelonina. En la inducción con arabinosa 1,0%,

ES 2 295 151 T3

en la cepa E226 apareció más producto que en la E220 en los instantes de tiempo correspondientes a las 3 y 4,5 horas, y en la muestra de arabinosa 1,0% apareció incluso una pequeña cantidad de gelonina después de 1,25 horas.

Ejemplo 3

Análisis del Crecimiento Celular y de la Expresión de Gelonina en E104, E221, E225 y E227 después de una Inducción con Arabinosa

Cuatro líneas celulares bacterianas $\Delta(\text{araBD})768$ (E104, E221, E225 y E227) que contenían cada una de ellas pING3825 se cultivaron en un medio TYE a una OD de aproximadamente 0,4 y se indujeron en alícuotas de 2,15 mL con arabinosa a 0, 0,1, 1 y 10 mM (10 mM 0,15%; 1 mM 0,015%; 0,1 mM 0,0015%). A las cuatro horas postinducción, se determinó la OD₆₀₀ de una dilución al 1:5 de cada uno de los cultivos, a continuación el cultivo se centrifugó para eliminar las células y el sobrenadante filtrado se situó a -20°C para una subsiguiente evaluación mediante un ELISA. De modo similar, a las 17 horas postinducción, se determinó la OD₆₀₀ de una dilución al 1:10 de cada uno de los cultivos, a continuación el cultivo se centrifugó para eliminar las células y el sobrenadante filtrado se situó a -20°C para una subsiguiente evaluación mediante un ELISA. La Tabla 4 ilustra la OD₆₀₀ del cultivo para cada una de las muestras.

TABLA 4

Densidad Óptica de cultivos de E104, E221, E225 y E227 inducidos con arabinosa

Cepa	mM arabinosa	OD (4 Horas)	OD (17 Horas)
E104	0	1,795	ND
	0,1	1,565	3,27
	1,0	0,745	0,91
	10	0,825	0,74
E221	0	1,815	ND
	0,1	1,975	3,32
	1,0	0,815	1,23
	10	0,665	0,93
E225	0	2,19	ND
	0,1	1,78	4,34
	1,0	1,55	2,3
	10	0,905	1,04
E227	0	2,12	ND
	0,1	1,89	3,56
	1,0	1,615	3,26
	10	1,025	1,25

ND= no determinado

Cada una de las muestras se evaluó mediante un ELISA para determinar la cantidad de gelonina que se había acumulado en el sobrenadante del cultivo después de la inducción con arabinosa. Los resultados de este ELISA se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Gelonina detectada por el ELISA después de una inducción con arabinosa (ng/mL)

Cepa	mM arabinosa	Gelonina ng/ml	
		4 Horas	17 Horas
E104	0	0,019	ND
	0,1	0,67	1,1
	1,0	44,5	115,8
	10	30,2	111,6
E221	0	0,014	ND
	0,1	0,022	,266
	1,0	26,2	103,6
	10	20,6	77
E225	0	0,016	ND
	0,1	0,067	2,45
	1,0	8,2	122
	10	29,4	101,6
E227	0	0,011	ND
	0,1	0,015	0,131
	1,0	7,0	85
	10	34	103,8

ND= no determinado

Los datos de las Tablas 4 y 5 demuestran que las cepas deficientes en el transporte de arabinosa presentan una inhibición del crecimiento por arabinosa después de la inducción menor que la E104, aunque son capaces de expresar gelonina hasta aproximadamente el mismo nivel o un nivel mayor que la E104 con arabinosa 10 mM después tanto de 4 como de 17 horas. Como la difusión pasiva de arabinosa a las células huésped es el único mecanismo que queda para la acumulación intracelular de arabinosa en la E227, esta cepa presenta aparentemente una menor inhibición del crecimiento a concentraciones bajas de arabinosa que la E104, y también produce menos gelonina con unas concentraciones bajas de arabinosa. Los efectos fenotípicos de la supresión de la AraFGH y la mutación de la AraE pueden verse de forma independiente en este conjunto de cepas huésped bacterianas inducidas. La E225 (*araE201*) produce, bien a las 4 ó bien a las 18 horas con arabinosa 0,1 mM más gelonina que la E221 ó la E227 (ambas son Δ *araFGH*), demostrando de este modo que el sistema de transporte AraFGH es más sensible a las concentraciones de arabinosa muy bajas. De forma similar, la E225 y la E227 producen menos gelonina con arabinosa 1,0 mM a las 4 horas, demostrando la importancia del sistema de transporte de AraE en esta concentración superior de arabinosa. Adicionalmente, parece que los efectos de la deficiencia en el transporte de arabinosa en los transportadores AraFGH y AraE son aditivos. El doble mutante presenta una menor inhibición en el crecimiento celular con una concentración alta de arabinosa que cualquiera de los mutantes simples, aunque las cepas AraE⁻ y AraEFGH⁻ producen aproximadamente las mismas cantidades de gelonina con arabinosa entre 1 y 10 mM. No obstante, con una concentración baja de arabinosa (0,1 mM), el doble mutante produce solamente un poco menos de gelonina que la que produce el mutante simple araF. Todas las cepas muestran una inducción similar, completa y rápida con arabinosa 10 mM en la que se supone que los sistemas de transporte no son esenciales para la acumulación de arabinosa intracelular. No obstante, con concentraciones menores de arabinosa en el medio, aparecen diferencias entre las cepas de tipo salvaje y mutantes. Las cepas AraE no resultan tan completamente inducidas tras 4 horas como lo son las cepas de tipo salvaje o AraFGH.

Los datos de los ejemplos demuestran que las cepas deficientes en el transporte de arabinosa que contienen vectores que codifican productos proteicos recombinantes resultan particularmente útiles como huéspedes para la expresión de productos proteicos recombinantes bajo el control inducible del promotor *araB*. Entre los diferentes aspectos y las sorprendentes ventajas de la presente invención se encuentran una menor inhibición del crecimiento celular bacteriano (por ejemplo, mayores números de células), una mayor expresión de los productos proteicos recombinantes, y una expresión regulable directamente, incluyendo una inducción sincronizada de la expresión por arabinosa, de productos proteicos recombinantes. Durante el crecimiento de células huésped deficientes en el transporte que contienen un

ES 2 295 151 T3

vector de expresión recombinante, en un fermentador, se espera que la adición de un bolo de un inductor, tal como arabinosa, para inducir el cultivo, inhiba el crecimiento celular menos que en un cultivo, por otro lado equivalente o comparable, de células huésped con una alta capacidad de transporte. De este modo, usando los métodos y las células huésped bacterianas de la presente invención se espera una mejora en la producción de productos proteicos recombinantes, incluyendo un mayor rendimiento de células y/o productos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un producto proteico recombinante bajo el control de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es el promotor *araB*, que comprende: (a) se introduce un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible en una célula huésped bacteriana que es genéticamente deficiente en un sistema para el transporte activo de un inductor de arabinosa del promotor hacia la célula huésped, en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*; y (b) se induce la expresión del producto con el inductor.

2. Método para producir un producto proteico recombinante bajo el control de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es el promotor *araB*, que comprende: (a) se cultiva una célula huésped bacteriana que es genéticamente deficiente en un sistema para el transporte activo de un inductor de arabinosa del promotor inducible hacia la célula huésped, en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*, y en el que la célula huésped contiene un vector de expresión que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible; y (b) se induce la expresión del producto con el inductor.

3. Método según la reivindicación 2, en el que el producto proteico recombinante se acumula en el periplasma o citoplasma de la célula huésped bacteriana, o es secretado hacia el medio de cultivo.

4. Método según la reivindicación 2, en el que la expresión de producto proteico recombinante es proporcional a la concentración de inductor en el medio de cultivo.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inductor es L-arabinosa.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula huésped no puede crecer con arabinosa.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración de arabinosa está entre el 0,00001% y el 10% (v/v).

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la célula huésped es *E. coli*.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula huésped es deficiente en el sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por el gen *araE*.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula huésped es deficiente en el sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por los genes *araFGH*.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula huésped es deficiente tanto en el sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por los genes *araFGH* como en el sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por el gen *araE*.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el sistema de transporte es de la *E. coli* o de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo las especies *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Enterobacter*.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa en la que se recupera el producto a partir de las células huésped inducidas.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el producto proteico recombinante es un producto proteico derivado de animales o vegetales, un producto proteico de mamíferos, o un producto proteico humano, que no sea un producto de genes indicadores o marcadores.

15. Método según la reivindicación 14, en el que el producto proteico recombinante es un agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

16. Método según la reivindicación 14, en el que el producto proteico recombinante es gelonina.

17. Célula huésped bacteriana que es deficiente en un sistema de transporte activo para un inductor de arabinosa de un promotor inducible, en el que el promotor inducible es el promotor *araB*, y en el que el sistema es un sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por un gen *araE* o un sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por un gen *araFGH*, en la que la célula huésped contiene un vector de expresión recombinante que codifica un producto proteico recombinante bajo el control del promotor inducible.

18. Célula huésped según la reivindicación 17, en la que el inductor es L-arabinosa.

ES 2 295 151 T3

19. Célula huésped según las reivindicaciones 17 ó 18, en la que la célula huésped no puede crecer con arabinosa.

20. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la que la célula huésped es *E. coli*.

5 21. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que la célula huésped es deficiente en el sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por el gen *araE*.

10 22. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que la célula huésped es deficiente en el sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por los genes *araFGH*.

23. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que la célula huésped es deficiente tanto en el sistema de transporte de arabinosa de alta afinidad codificado por los genes *araFGH* como en el sistema de transporte de arabinosa de baja afinidad codificado por el gen *araE*.

15 24. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en la que el sistema de transporte es de la *E. coli* o de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo las especies *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Enterobacter*.

20 25. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en la que el producto proteico recombinante es un producto proteico derivado de animales o vegetales, un producto proteico de mamíferos, o un producto proteico humano, que no sea un producto de genes indicadores o marcadores.

26. Célula huésped según la reivindicación 25, en la que el producto proteico recombinante es un agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

25 27. Célula huésped según la reivindicación 25, en la que el producto proteico recombinante es gelonina.

30

35

40

45

50

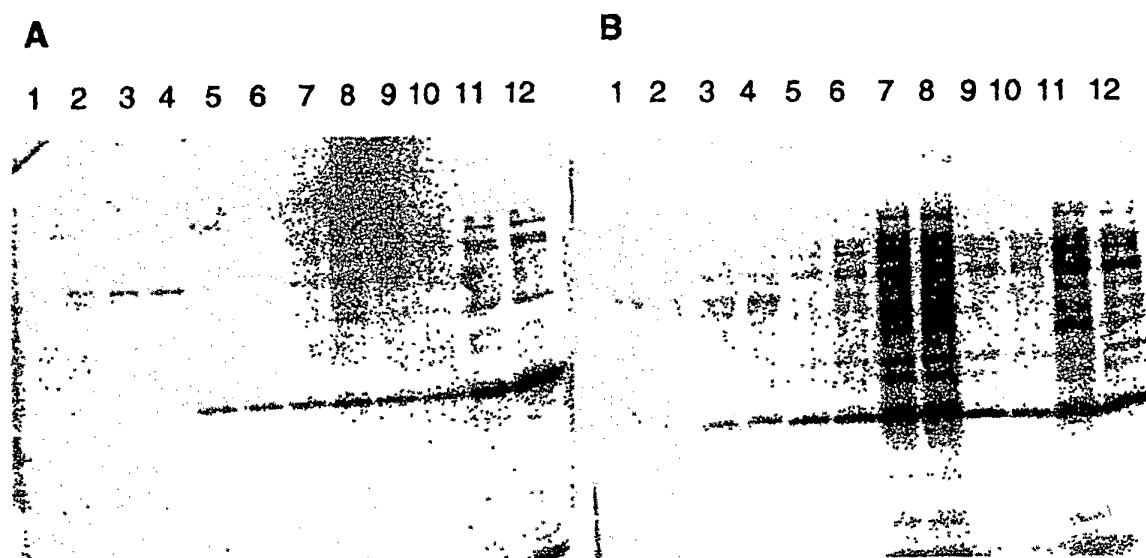
55

60

65

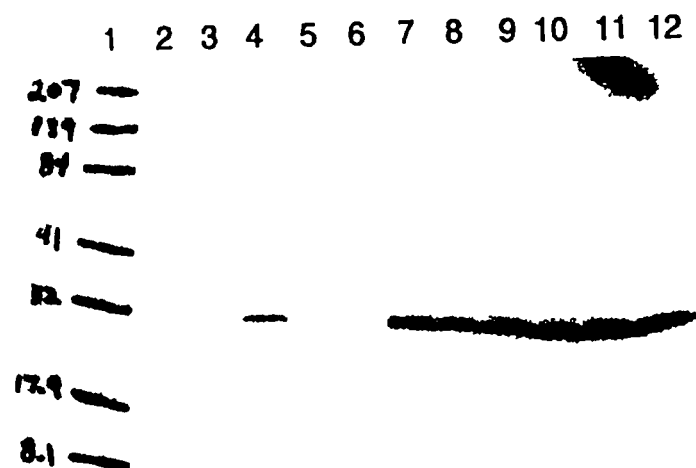
Fig 1.

Calle 1	Transductor 1	0.01% arabinosa
Calle 2	Transductor 2	0.01% arabinosa
Calle 3	Transductor 3	0.01% arabinosa
Calle 4	Transductor 4	0.01% arabinosa
Calle 5	Transductor 5	0.01% arabinosa
Calle 6	E220	0.01% arabinosa
Calle 7	E226	0.01% arabinosa
Calle 8	Transductor 2	1.0% arabinosa
Calle 9	Transductor 3	1.0% arabinosa
Calle 10	Transductor 5	1.0% arabinosa
Calle 11	E220	1.0% arabinosa
Calle 12	E226	1.0% arabinosa

Fig 2

Calle 1	W3110	0.01% arabinosa
Calle 2	E220	0.01% arabinosa
Calle 3	E224	0.01% arabinosa
Calle 4	E226	0.01% arabinosa
Calle 5	W3110	0.1% arabinosa
Calle 6	E220	0.1% arabinosa
Calle 7	E224	0.1% arabinosa
Calle 8	E226	0.1% arabinosa
Calle 9	W3110	1.0% arabinosa
Calle 10	E220	1.0% arabinosa
Calle 11	E224	1.0% arabinosa
Calle 12	E226	1.0% arabinosa

Fig 3



Calle	Patrón de tamaño	Inducción
Calle 1		
Calle 2	E220	sin inducción
Calle 3	E226	sin inducción
Calle 4	E220	0.01% arabinosa
Calle 5	E224	0.01% arabinosa
Calle 6	E226	0.01% arabinosa
Calle 7	E220	0.1% arabinosa
Calle 8	E224	0.1% arabinosa
Calle 9	E226	0.1% arabinosa
Calle 10	E220	1.0% arabinosa
Calle 11	E224	1.0% arabinosa
Calle 12	E226	1.0% arabinosa

Fig 4

