



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 126**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03788625 .6**

96 Fecha de presentación : **18.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1539948**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Procedimientos mejorados de síntesis de proteínas *in vitro*.**

30 Prioridad: **19.08.2002 US 404591 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

73 Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland
Stanford Junior University
1705 El Camino Real
Palo Alto, California 94306-1106, US**

72 Inventor/es: **Swartz, James Robert y
Jewett, Michael Christopher**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 334 126 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

Procedimientos mejorados de síntesis de proteínas *in vitro*.

5 Antecedentes de la invención

La síntesis de proteínas es un proceso biológico fundamental que subyace en el desarrollo de productos terapéuticos de polipéptidos, diagnósticos y enzimas industriales. Con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante (ADNr), se ha hecho posible aprovechar la maquinaria catalítica de la célula para producir una proteína deseada. Esto se puede lograr en el entorno celular o *in vitro* usando extractos derivados de las células.

Durante la última década, la productividad de los sistemas libres de células ha mejorado en 2 órdenes de magnitud, de alrededor de 5 mg/ml-hr a aproximadamente 500 mg/ml-hr. Este logro ha hecho la síntesis de proteínas *in vitro* una técnica práctica para la investigación en laboratorio, y proporciona una tecnología de plataforma para la expresión de proteínas de alto rendimiento. También comienza a sugerir la posibilidad de utilización de tecnologías libres de células como medio alternativo para la producción *in vivo* a gran escala de productos farmacéuticos de proteínas.

La síntesis de proteínas libre de células ofrece varias ventajas sobre los procedimientos de expresión de proteínas convencionales, *in vivo*. Los sistemas libres de células puede dirigirse a la mayoría, si no a todos, los recursos metabólicos de la célula a la producción exclusiva de una proteína. Por otra parte, la falta de una pared de célula y los componentes de membrana *in vitro* es ventajosa, ya que permite el control del entorno de la síntesis. Por ejemplo, los niveles de ARNt se pueden cambiar para reflejar el uso de codones de genes que se expresan. El potencial redox, el pH, o la fuerza iónica también pueden modificarse con mayor flexibilidad que *in vivo*, ya que no están preocupados por el crecimiento o la viabilidad de las células. Además, la recuperación directa de productos proteínicos purificados, plegados adecuadamente se puede alcanzar fácilmente.

La traducción *in vitro* también se reconoce por su capacidad para incorporar aminoácidos antinaturales y etiquetados con isótopos, así como su capacidad para producir proteínas que son inestables, insolubles, o citotóxicas *in vivo*. Además, la síntesis de proteínas libre de células puede jugar un papel en la revolución de la ingeniería de proteínas y las tecnologías de cribado proteómicas. El procedimiento libre de células esquivar los laboriosos procesos necesarios requeridos para la clonación y la transformación de las células para la expresión de nuevos productos génicos *in vivo*, y se está convirtiendo en una plataforma tecnológica para este campo.

A pesar de todas las características prometedoras de la síntesis de proteínas libres de células, su uso práctico y su aplicación a gran escala ha sido limitada por varios obstáculos. Entre estos obstáculos están los cortos tiempos de reacción y las bajas tasas de producción de proteínas, que producen bajos rendimientos de la síntesis de proteínas y un costo excesivo de reactivos. El trabajo pionero de Spirin *et al.* (1988) Science 242:1162-1164 eludieron inicialmente el problema del corto tiempo de reacción con el desarrollo de un sistema de flujo continuo. Muchos laboratorios han duplicado y mejorado este trabajo, pero todos han usado principalmente procedimientos que suministran constantemente sustratos a la cámara de reacción. Esta aproximación aumenta la duración de la reacción de la traducción y la producción de proteínas en comparación con el sistema de lotes. Sin embargo, es ineficiente en el uso de reactivos caros, por lo general produce un producto disuelto, y no ha proporcionado mejoras significativas en los índices de producción.

El sistema de proceso por lotes convencional ofrece varias ventajas sobre los esquemas continuos y semicontinuos, que incluyen la facilidad de ampliación, reproducción, aumento de los índices de producción de proteínas, la comodidad, la aplicabilidad de formatos multiplexados para expresión de alto rendimiento, y el uso de sustratos más eficientes. Estas ventajas hacen de la mejora de la productividad del sistema del proceso por lotes crucial para la utilización industrial de la síntesis de proteínas libres de células. Recientemente, se ha informado de una serie de hallazgos que empezar a dilucidar las causas de la terminación anticipada de la síntesis de proteínas en las reacciones de lotes. Además, Kim y Swartz (2001) Biotechnol Bioeng. 74:309-316; Kim y Swartz (1999) Biotechnol Bioeng. 66:180-188 han demostrado que la duración de la reacción de lotes convencional podría extenderse desde 20 minutos hasta un máximo de 2 horas con el uso de nuevos sistemas de regeneración de energía. Si bien estas aproximaciones son prometedoras, todavía hay una tremenda necesidad de desarrollar un proceso comercial viable económicamente. Aumentar el rendimiento del producto mediante la mejora del índice de producción de proteínas y la ampliación del tiempo de reacción es un componente esencial para satisfacer esta necesidad. Reducir el coste de los reactivos de síntesis de proteínas, especialmente la fuente de energía química, es otro componente importante.

60 Literatura relevante

Patente US 6.337.191 B1, Swartz *et al.* Kim y Swartz (2000) Biotechnol Prog. 16:385-390; Kim y Swartz (2000) Biotechnol Lett. 22:1537-1542; Kim y Choi (2000) J Biotechnol. 84:27-32; Kim *et al.* (1996) Eur J Biochem. 239:881-886.

65

Descripción de la invención

Se proporcionan composiciones y procedimientos para síntesis *in vitro* de moléculas biológicas. En particular, la presente invención proporciona una mezcla de reacción para la transcripción *in vitro* de ARNm y/o la traducción de polipéptidos, comprendiendo la mezcla:

un extracto de células bacterianas crecidas en medio que contienen glucosa y que comprende vesículas de membrana invertida que contienen componentes de cadena respiratoria y F_1F_0 ATPase; componentes de polipéptidos y/o maquinaria de síntesis de ARNm; una plantilla para la transcripción de dicho ARNm y/o la traducción de dicho polipéptido; nucleótidos y/o aminoácidos para la síntesis de dicho ARNm y/o dichos polipéptidos; y cofactores, enzimas y otros reactivos necesarios para dicha transcripción y/o traducción;

en donde dicha mezcla de reacción está prácticamente exenta de polietileno glicol; comprende magnesio en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM y comprende una o más de espermina, espermidina y putrescina;

en donde la mezcla de reacción proporciona las condiciones que permitan la transcripción *in vitro* de ARNm y/o la traducción de polipéptidos; y la activación de la fosforilación oxidativa, que es sensible a los inhibidores de la cadena de transporte de electrones.

Las condiciones óptimas para la síntesis permiten la activación *in vitro* de la fosforilación oxidativa en la mezcla de reacción, que proporciona un rendimiento mejorado del producto de la síntesis. Las condiciones también proporcionan un aumento del rendimiento de los polipéptidos biológicamente activos, mediante la mejora de las condiciones para el plegado. La activación de la fosforilación oxidativa se puede evidenciar por la capacidad de la mezcla de reacción para generar la síntesis de un polímero en ausencia de fuentes de energía secundarias o intermediarios glucolíticos que actualmente se utilizan. La activación de la fosforilación oxidativa también puede demostrarse por la sensibilidad de la mezcla de reacción a los inhibidores específicos de esta vía.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que representa la síntesis de proteínas *in vitro* con el sistema de componentes de la presente invención, en ausencia y en presencia de piruvato añadido. Incluso en ausencia de piruvato añadido, se produce una síntesis de proteínas significativa.

La Figura 2 es una gráfica de barras que representa el nivel de la síntesis de proteínas, comparando los extractos de bacterias cultivadas en diferentes condiciones. Se puede observar que el extracto de células producidas por bacterias cultivadas en un medio que contiene glucosa proporciona unos resultados mucho mejores, así como la ausencia de PEG en la mezcla de reacción.

Figura 3. Dependencia de magnesio del sistema. Se incubaron reacciones de 15 μ l durante 6 horas con cantidades crecientes de Mg. La concentración de Mg que se muestra incluye el Mg presente en el extracto celular. La expresión de CAT se determinó a partir de la incorporación de 14 C-leucina. Las barras de error representan la desviación estándar de tres a ocho experimentos independientes.

La figura 4 es un gráfico comparativo de los niveles de fosfato en reacciones de síntesis *in vitro*.

La figura 5 es una gráfica que ilustra la capacidad de los actuales procedimientos para mantener los niveles de pH.

La figura 6 es una gráfica de barras que representa el efecto del oxígeno y HQNO, un inhibidor de la fosforilación oxidativa, en la síntesis *in vitro* usando la presente invención.

Figura 7. Experimentos suministrados por lotes de 5 ml con el nuevo sistema de síntesis de proteínas *in vitro*.

Figura 8. Expresión CAT, comparando el sistema PANOX con piruvato y el sistema Cytomim con piruvato.

Descripción detallada de las realizaciones

Se proporcionan composiciones y procedimientos para la transcripción de ARNm g mejorada *in vitro* y/o la traducción de polipéptidos, en el cual se activa la fosforilación oxidativa, proporcionando mayores rendimientos y una mejor utilización de fuentes de energía. El sistema se conoce aquí como sistema Cytomim. Se obtiene un rendimiento mejorado mediante una combinación de condiciones de reacción, cuyas condiciones pueden incluir, sin limitación, el uso de extractos biológicos derivados de bacterias cultivadas en un medio que contiene glucosa, la ausencia de polietileno glicol, y la concentración de magnesio optimizado.

La síntesis de proteínas libre de células aprovecha el poder catalítico de la maquinaria celular. La obtención de los rendimientos máximos de proteína *in vitro* requiere el suministro de un sustrato adecuado, por ejemplo, trifosfato

de nucleósido y aminoácidos; un medio homeostático; estabilidad del catalizador; y la eliminación o la evasión de subproductos inhibidores. La optimización de las reacciones de síntesis *in vitro* se beneficia de la recreación del estado *in vivo* de un organismo de rápido crecimiento.

Los procedimientos y las composiciones de la presente invención reflejan mejor el ambiente citoplasmático de una célula bacteriana, y producen mejoras significativas en la producción de proteínas y el plegamiento de las proteínas en los procedimientos de la técnica anterior. Además, la vía de la fosforilación oxidativa se ha activado. Las condiciones de reacción que generan este ambiente más natural se producen al proporcionar una combinación de factores, tal como se describe anteriormente. Este sistema es capaz de una producción de proteínas significativa de hasta 6 horas en una reacción de lotes *in vitro*. Remarcablemente, el sistema no requiere la adición de fuentes secundarias de energía comúnmente usadas, tal como fosfato de fosfoenolpiruvato, creatina, acetil fosfato, glucosa-6-fosfato, piruvato o intermedios glicolíticos. Al imitar el entorno celular, se proporciona una mayor capacidad de síntesis.

En realizaciones preferidas de la invención, una mezcla de reacción tal como se describe aquí se utiliza para la síntesis, donde la reacción proporciona la activación de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, ciertos beneficios de la invención, incluyendo la síntesis mejorada de polipéptidos activos a través de mejores condiciones para el plegamiento de proteínas, no requieren la activación de la fosforilación oxidativa. La realización de síntesis en ausencia substancial de polietileno glicol proporciona un plegado mejorado y, además se puede combinar con, por ejemplo, los procedimientos descritos en la patente US 6.548.276.

El plegado, tal como se utiliza aquí, se refiere a la estructura tridimensional de las proteínas y polipéptidos o al proceso de consecución de tal estructura, donde las interacciones entre los residuos de aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Aunque las interacciones no covalentes son importantes en la determinación de la estructura, por lo general los péptidos y las proteínas de interés tienen enlaces intra y/o intermoleculares covalentes formados por dos residuos de cisteína. Para proteínas de origen natural y los polipéptidos o derivados y variantes de las mismas, el plegado correcto es normalmente la disposición que produce una actividad biológica óptima, y puede ser convenientemente monitorizada mediante ensayos de actividad, *por ejemplo* unión de ligando, actividad enzimática, etc.

En algunos casos, por ejemplo, cuando el producto deseado es de origen sintético, los ensayos basados en la actividad biológica serán menos significativos. El correcto plegado de las moléculas podrá determinarse sobre la base de las propiedades físicas, las consideraciones energéticas, los estudios de simulación, etc.

El sistema Cytomim es homeostático respecto a las concentraciones de fosfato y al pH, la duración de la síntesis de proteínas se prolonga significativamente, y la síntesis biológica puede producirse incluso en ausencia de fuentes de energía secundaria evidentes. Una de las ventajas de los procedimientos es la capacidad de utilizar fuentes de energía baratas para la síntesis. Otra ventaja es la capacidad de generar mayores rendimientos. En una reacción similar, el sistema Cytomim puede prever rendimientos mejorados aproximadamente 2 veces mayor; aproximadamente 3 veces mayor, y puede ser de aproximadamente 8 veces mayor, o más, cuando la comparación se basa en el sistema PANOX, según lo descrito por Kim y Swartz (2000), *supra*.

Síntesis *in vitro*, tal como se utiliza aquí, se refiere a la síntesis libre de células de macromoléculas biológicas en una mezcla de reacción que comprende extractos biológicos y/o reactivos definidos. La mezcla de reacción comprenderá una plantilla para la producción de la macromolécula, por ejemplo, ADN, ARNm, etc.; monómeros para macromolécula a sintetizar, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc., y estos cofactores, enzimas y otros reactivos que son necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores de transcripción, etc. Dichos sistemas de reacción de síntesis son bien conocidos en la técnica, y han sido descritos en la literatura. La reacción de síntesis libre de células se puede realizar como lotes, flujo continuo, o semiflujo continuo, tal como se conoce en la técnica.

El ambiente más natural para la síntesis utiliza extractos celulares derivados de células bacterianas cultivadas en un medio con glucosa y fosfato, donde la glucosa está presente en una concentración de al menos un 0,25% (peso/volumen), con más frecuencia al menos un 1%, y generalmente no más de un 4%, más generalmente no más de un 2%. Un ejemplo de estos medios es medio 2YTPG, sin embargo uno experto en la materia podrá apreciar que muchos medios de cultivo pueden adaptarse para este propósito, ya que hay muchos medios publicados adecuados para el crecimiento de bacterias tales como *E. coli*, utilizando tanto las fuentes nutrientes definidas como las no definidas (ver Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY para los ejemplos de medios que contienen glucosa).

Otro cambio importante en la mezcla de reacción es la ausencia importante de polietileno glicol (PEG). Una mezcla de reacción convencional (por ejemplo, ver Kim y Swartz, 2001) contiene aproximadamente un 2% de polietileno glicol 8000. Sin embargo, se ha encontrado que esto disminuye el rendimiento. En los procedimientos actuales, las moléculas de espermidina y putrescina se utilizan en lugar de PEG. La espermina y la espermidina están presentes en una concentración de al menos 0,5 mM aproximadamente, por lo general al menos 1 mM, preferiblemente 1,5 mM y no más de 2,5 mM aproximadamente. La putrescina está presente en una concentración de al menos 0,5 mM aproximadamente, preferiblemente al menos 1 mM aproximadamente, preferiblemente 1,5 mM, y no más de 2,5 mM aproximadamente.

La concentración de magnesio en la mezcla de reacción afecta a la síntesis general. A menudo hay magnesio presente en los extractos de células, que luego se puede ajustar con magnesio adicional para optimizar la concentración. Fuentes de sales de magnesio útiles en estos procedimientos son conocidos en la técnica. En una realización de la invención, la fuente de magnesio es glutamato de magnesio. Una concentración de magnesio preferida es de por lo menos 5 mM aproximadamente, generalmente al menos 10 mM aproximadamente, y preferiblemente un mínimo de 12 mM, y en una concentración de no más de 20 mM aproximadamente, por lo general no más de 15 mM aproximadamente. Otros cambios que pueden aumentar la síntesis incluyen la eliminación de tampón HEPES y fosfoenolpiruvato de la mezcla de reacción.

El sistema actual es el primero en demostrar la síntesis de proteínas sin una fuente de energía secundaria, tal como PEP, fosfato de creatina y fosfato de acetilo, o intermediarios glucolíticos, tal como glucosa, glucosa-6-fosfato, y piruvato. Además, no requiere la adición de enzimas exógenas. El piruvato se ha usado para mejorar la síntesis de proteínas, aunque no es obligatorio, tal como se observa en la figura 1. Por más eficazmente que se reproduzcan las condiciones del citoplasma y la utilización de condiciones que son fisiológicamente más relevantes, el nuevo sistema mantiene la homeostasis mejor que se usa convencionalmente en sistemas libres de células. El sistema actual no acumula fosfato, que se sabe que inhibe la síntesis de proteínas. Las fuentes secundarias de energía convencionales producen acumulación de fosfato. Además de evitar la acumulación de un inhibidor de la síntesis de proteínas, el sistema actual es capaz de mantener un pH estable en el transcurso de la reacción.

Tal como se señaló anteriormente, las composiciones y los procedimientos de la presente invención permiten la producción de proteínas sin una fuente de energía secundaria; sin embargo, una fuente de energía secundaria puede añadirse para completar la síntesis. En particular, los intermediarios glucolíticos, tal como glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato, triosafosfato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato (PEP), y piruvato pueden utilizarse.

Otros compuestos útiles como fuente de energía son los compuestos que generan equivalentes de reducción, o activan una ruta que generan equivalentes de reducción. Estos compuestos incluyen aminoácidos, por ejemplo, glutamato, compuestos en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), citrato, cis-aconitato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato oxalacetato, y glioxilato, o compuestos que pueden ser dirigidos en el metabolismo central (glucólisis y el ciclo del TCA). Es preferible que las fuentes de energía secundarias, si se añaden, sean homeostáticas respecto a la acumulación de fosfato, tal como glucosa o glutamato. La fuente de energía puede suministrarse en concentraciones de al menos 10 mM aproximadamente, al menos 20 mM aproximadamente, más generalmente, al menos, 30 mM aproximadamente. Estos compuestos no se suelen añadir en concentraciones superiores a 250 mM aproximadamente, más generalmente no superior a 150 mM aproximadamente. Cantidades adicionales de la fuente de energía pueden añadirse a la mezcla de reacción durante el curso de la expresión de proteínas, para extender los tiempos de reacción.

El sistema puede funcionar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El oxígeno puede ser suministrado, en particular para las reacciones mayores de 15 μ l, con el fin de aumentar los rendimientos de síntesis. El espacio delantero de la cámara de reacción puede llenarse con oxígeno, el oxígeno puede insuflarse en la mezcla de reacción, etc. El oxígeno se puede suministrar de forma continua o el espacio delantero de la cámara de reacción se puede rellenar en el transcurso de la expresión de proteínas para tiempos de reacción más largos. Otros receptores de electrones, tales como nitrato, sulfato, o fumarato también pueden ser suministrados en conjunción con la preparación de extractos celulares, de manera que las enzimas necesarias están presentes en el extracto celular.

No es necesario añadir cofactores exógenos para la activación de la fosforilación oxidativa. Compuestos tales como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), NAD⁺, o acetil-coenzima A se puede utilizar para complementar los rendimientos de la síntesis de proteínas, pero no son necesarios. La adición de ácido oxálico, un inhibidor del metabolismo de la sintetasa fosfoenolpiruvato (Pps), puede ser beneficioso en el aumento de los rendimientos de proteína, pero no es necesario.

La plantilla para la síntesis de proteínas libre de células puede ser ARNm o ADN. La traducción de la transcripción de ARNm estabilizado o acoplado y la traducción convierten la información almacenada en la proteína. El sistema acoplado, generalmente utilizado en sistemas *E. coli*, genera continuamente ARNm de una plantilla de ADN con un promotor reconocible. Cualquier de ARN de polimerasa endógena se utiliza, o un ARN de polimerasa de fago exógeno, típicamente T7 o SP6, se añade directamente a la mezcla de reacción. Alternativamente, el ARNm se puede amplificar continuamente mediante la inserción del mensaje en una plantilla para replicasa QB, un ARN de polimerasa dependiente del ARN. El ARNm purificado generalmente se estabiliza mediante modificación química antes de que se agregue a la mezcla de reacción. Las nucleasas se pueden eliminar de los extractos para ayudar a estabilizar los niveles de ARNm. La plantilla puede codificar para cualquier gen particular de interés.

Otras sales, particularmente aquellas que son biológicamente relevantes, tal como manganeso, también pueden agregarse. El potasio está generalmente presente en una concentración de al menos 50 mM aproximadamente, y no más de 250 mM aproximadamente. Amonio puede estar presente, usualmente en una concentración no mayor de 200 mM, más generalmente, en una concentración de no más de 100 mM aproximadamente. Normalmente, la reacción se mantiene en el rango de pH de alrededor de 5-10 y una temperatura de 20°-50°C, más generalmente, en el rango de pH de alrededor de 6-9 y una temperatura de 25°-40°C. Estos rangos pueden extenderse para condiciones específicas de interés.

Inhibidores metabólicos de actividad enzimática de reacciones adversas pueden añadirse a la mezcla de reacción. Alternativamente, las enzimas o factores que son responsables de la actividad no deseada pueden eliminarse directamente del extracto o el gen que codifica la enzima no deseable se puede inactivar o eliminar del cromosoma.

- 5 También se pueden añadir al sistema vesículas, ya sea purificadas a partir del organismo huésped (véase Muller y Blobel (1984) “*In vitro* translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*”, PNAS 81:7421-7425) o sintéticos. Estos pueden ser utilizados para mejorar la síntesis y el plegado de proteínas. La tecnología aquí descrita se ha mostrado que activa el proceso de fosforilación oxidativa, que utiliza componentes de la membrana citoplasmática. Deben estar presentes vesículas de membrana invertidas que contienen componentes de la cadena respiratoria y F_1F_0 ATPase para la activación de la fosforilación oxidativa. Los procedimientos actuales también pueden utilizarse para activar las reacciones libres de células de otros grupos de proteínas de la membrana, por ejemplo, para insertar o translocar proteínas o la translocación de otros compuestos.

Procedimientos para una síntesis *in vitro* mejorada

- 15 Los sistemas sintéticos de interés incluyen sistemas para la replicación de los biopolímeros, que pueden incluir la amplificación de ADN, la transcripción del ARN de las plantillas de ADN o ARN, la traducción del ARN en polipéptidos, y la síntesis de hidratos de carbono complejos de azúcares simples. La síntesis mejorada puede incluir incrementos en la cantidad total o relativa de polipéptidos sintetizados en el sistema; incremento de la cantidad total o relativa de polipéptidos sintetizados por unidad de tiempo; incremento de la cantidad total o relativa de los polipéptidos biológicamente activos sintetizados en el sistema; aumento en la cantidad total o relativa de los polipéptidos solubles sintetizados en el sistema, y similares.

- 25 Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala, de pequeña escala, o pueden ser multiplexadas para llevar a cabo una pluralidad de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas utilizarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos, y se puede aislar el producto final como parte del proceso. Los sistemas de lotes son también de interés, donde los reactivos adicionales pueden ser introducidos para prolongar el período de tiempo para la síntesis activa. Un reactor puede funcionar en cualquier modo, como lote, lote ampliado, semilote, semicontinuo, alimentación de lotes y continuo, y que serán seleccionados en conformidad con la finalidad de aplicación.

- 30 Las reacciones pueden ser de cualquier volumen, ya sea en pequeña escala, por lo general al menos 1 μ l aproximadamente y no más de 15 μ l aproximadamente, o en una reacción escalada, donde el volumen de reacción es por lo menos de 15 μ l aproximadamente, por lo general al menos 50 μ l aproximadamente, más generalmente, al menos, 100 μ l aproximadamente, y puede ser de 500 μ l, 1000 μ l o mayor. En la mayoría de los casos, las reacciones individuales no serán más de 10 ml aproximadamente, a pesar de que múltiples reacciones se pueden ejecutarse en paralelo. Sin embargo, en principio, las reacciones pueden realizarse a cualquier escala, siempre que se suministre el oxígeno suficiente (o aceptor de electrones de otro tipo).

- 40 De particular interés es la traducción del ARNm para producir proteínas, cuya traducción puede acoplarse a la síntesis *in vitro* de ARNm de una plantilla de ADN. Este sistema sin células contendrá todos los elementos necesarios para la traducción de ARNm, por ejemplo ribosomas, aminoácidos, ARNt, aminoacil sintetazas, factores de elongación, factores de iniciación, y factores de reciclaje de ribosomas. Sistemas libres de células conocidos en la técnica son extractos *E. coli*, etc., que pueden ser tratados con una nucleasa adecuada para eliminar el ARN endógeno activo.

- 45 Además de los componentes anteriores, tal como extracto libre de células, plantilla genética, y aminoácidos, los materiales específicamente requeridos para la síntesis de proteínas pueden añadirse a la reacción. Estos materiales incluyen sal, ácido fólico, AMP cíclico, inhibidores de proteína o ácido nucleico de enzimas degradantes, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, reguladores potencial(es) de la oxidación/reducción, tensioactivos no desnaturizantes, componentes del tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc.

- 50 Las sales preferiblemente incluyen potasio, magnesio y sales de amonio (por ejemplo, de ácido acético o ácido sulfúrico). Una o más de dichas sales pueden tener los aminoácidos como anión contrario. Existe una interdependencia entre las especies iónicas para una concentración óptima. Estas especies iónicas típicamente se optimizan respecto a la producción de proteínas. Al cambiar la concentración de un componente particular del medio de reacción, otro componente puede ser modificado en consecuencia. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes tales como nucleótidos y compuestos de las fuentes de energía pueden controlarse a la vez de acuerdo con el cambio en las de otros componentes. Además, los niveles de concentración de los componentes en el reactor pueden variarse con el tiempo. El ajustador potencial de la oxidación/reducción puede ser ditiotritol, ácido ascórbico, glutatona y/o sus formas oxidadas. Además, un surfactante no desnaturizantes tal como el Triton X-100 está opcionalmente incluido, en una concentración no mayor de 500 mM aproximadamente, más generalmente no mayor de 250 mM aproximadamente.

- 65 Cuando se utilizan medios de aislamiento de proteínas en un modo de funcionamiento continuo, la salida del producto del reactor fluye a través de una membrana y a los medios de aislamiento de la proteína. En un semimodo de operación continua, la superficie exterior o interior de la membrana se pone en contacto con las soluciones predeterminadas que se cambian en función del ciclo en un orden predeterminado. Estas soluciones contienen sustratos, tales como aminoácidos y nucleótidos. En este momento, el reactor se operó en modo de diálisis, lote de diafiltración o alimentado por lotes. Una solución de alimentación puede suministrarse al reactor a través de la misma membrana o

una unidad de inyección diferente. La proteína sintetizada se acumula en el reactor, y luego se aísla y se purifica de acuerdo con el procedimiento habitual para la purificación de proteínas después de la finalización de la operación del sistema.

5 Cuando hay un flujo de reactivos, la dirección de flujo del líquido puede ser perpendicular y/o tangencial a una membrana. El flujo tangencial es eficaz para el reciclaje de ATP y para la prevención de la obstrucción de la membrana y puede estar superpuesta sobre el flujo perpendicular. El flujo perpendicular a la membrana puede ser causado o realizarse mediante una bomba de presión positiva o una bomba de succión de vacío. La solución en contacto con la superficie exterior de la membrana puede cambiarse en función del ciclo, y puede estar en un constante flujo tangencial
10 respecto a la membrana. El reactor puede agitarse interna o externamente mediante medios de agitación adecuados.

Durante la síntesis de proteínas en el reactor, los medios de aislamiento de proteínas aíslan selectivamente la proteína deseada puede incluir una unidad empaquetada con partículas recubiertas de moléculas de anticuerpos u otras moléculas inmovilizadas con un componente para adsorber la proteína deseada sintetizada, y una membrana con poros
15 de un tamaño adecuado. Preferentemente, los medios de aislamiento de las proteínas comprenden dos columnas para uso alternativo.

La cantidad de proteínas producidas en una reacción de traducción se puede medir de varias formas. Un procedimiento se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular que se está traduciendo. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad de la proteína es un sistema de ensayo de luciferasa, o un sistema de ensayo cloramfenicol de acetil transferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteínas funcionalmente activas producidas por la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán las proteínas de longitud completa que están inactivas debido al inadecuado plegamiento de las proteínas o a la falta de otras modificaciones posteriores de traslación necesarias para la actividad de la proteína.
25

Otro procedimiento para medir la cantidad de proteína producida en la transcripción *in vitro* acoplada y las reacciones de la traducción es para llevar a cabo las reacciones usando una cantidad conocida de aminoácidos radiomarcados como ³⁵S-metionina, ³H-leucina o ¹⁴C-leucina y posteriormente medir la cantidad de aminoácidos radiomarcados incorporados en la proteína recién traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro*, incluyendo productos de proteína truncados. La proteína radiomarcada también se puede separar en un gel de proteínas, y mediante autorradiografía se confirma que el producto es del tamaño adecuado y que los productos proteicos secundarios no se han producido.
30

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o géneros animales, las construcciones, y los reactivos particulares descritos, como tales, pueden, por supuesto, variar. También es necesario comprender que la terminología aquí utilizada tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no está pensada para limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.
35

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente se entienden por un experto en la materia a la que pertenece esta invención, aunque los procedimientos, dispositivos y materiales, similares o equivalentes a los aquí descritos pueden utilizarse en la práctica o para probar la invención, los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.
40

Todas las publicaciones aquí mencionadas tienen el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las líneas celulares, construcciones, y las metodologías que se describen en las publicaciones, que pueden ser utilizadas en relación con la invención que se describe ahora. Las publicaciones descritas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derechos anteriores a dicha divulgación, en virtud de una invención previa.
45
50

Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y la descripción de cómo hacer y utilizar la invención en cuestión, y no están destinadas a limitar el alcance de lo que se considera la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud respecto a los números que se utilizan (por ejemplo, las cantidades, la temperatura, la concentración, etc.), pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es o está cerca de la atmósfera.
55

60 Experimental

Ejemplo 1

Una mezcla de reacción estándar para una reacción de transcripción- traducción acoplada, en lo sucesivo denominado como sistema PANOx (Kim y Swartz (2001), *supra*.) contiene los siguientes componentes: 57 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 1,2 mM ATP, 0,85 mM cada uno de GTP, UTP y CTP, 1 mM DTT, 200 mM glutamato de potasio, 80 mM acetato de amonio, 16 mM acetato de magnesio, 34 µg/ml ácido fólico, 170,6 mg/ml mezcla *E. coli* de ARNt, 13,3 mg/ml plásmido, 100 mg/ml polimerasa T7 ARN, 2 mM de cada uno de 20 aminoácidos sin etiqueta, 11 µM [¹⁴C]
65

leucina, 2% poli (etilenglicol) 8000, 33 mM PEP, 0,33 mM dinucleótido de nicotinamida adenina, 0,26 mM coenzima A, 2,7 mM oxalato de sodio y 0,24 volúmenes de extracto S30. La síntesis de proteínas libre de células procariotas se realiza mediante un extracto S30 crudo derivado de *Escherichia coli* K12 (cepa A19 Δ tonA Δ tnaA Δ speA Δ endA met+), con ligeras modificaciones en el protocolo de Pratt, J.M. 1984. (Transcripción-traducción acopladas en sistemas libres de células procariotas. En Transcription and translation: a practical approach, Hanes, B.D., y S.J. Higgins. (Eds.) p. 179-209. IRL Press, Nueva York). Se preparó ARN de polimerasa T7 a partir de cepa BL21 de *E. coli* (pAR1219) de acuerdo con los procedimientos de Davanloo *et al.* 1984. (Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 81:2035-2039).

El ambiente Cytomim para la síntesis, de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, es el siguiente: extracto de células que se cultivan con medio 2YTPG (Kim y Choi), que contiene glucosa y fosfato. Con referencia al sistema PANOX descrito anteriormente, se retira el tampón HEPES, la concentración de glutamato de potasio se reduce a 130 mM, se utiliza 10 mM glutamato de amonio en lugar de 80 mM de acetato de amonio, se utiliza 8 mM de glutamato de magnesio en lugar de 16 mM de acetato de magnesio, poli 2% (etileno glicol) 8000 se sustituye con 1,5 mM de espermidina y 1 mM de putrescina, la concentración de ARN de polimerasa T7 es mayor de 100 mg/ml, la concentración de plásmidos se aumenta a 13,3 mg/ml, y se retira el fosfoenolpiruvato de la reacción. El sistema puede ser mejorado con la adición de piruvato sódico 33 mM, aunque esto no es necesario. Hubo aproximadamente 3,3 mM de magnesio, 14,4 mM de potasio, 2,4 mM de TRIS, y 23,5 mM de acetato adicional en cada reacción procedentes del extracto celular.

Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 5-6 horas. La cantidad de proteína sintetizada se estima a partir de la radiactividad de ACT insoluble medida utilizando un contador de cintilación líquido (Beckman LS3801), (Kim *et al.* 1996). Los rendimientos de proteína soluble se determinaron tal como se describió anteriormente, (Kim y Swartz, 2000).

La figura 1 muestra la producción de proteínas de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) con las composiciones y procedimientos indicados en la presente invención. Las barras de error representan la desviación estándar de 4 experimentos separados. La nueva mezcla de reacción, según lo especificado anteriormente, fue complementada con 33 mM de piruvato sódico, cuadrados, o no, círculos.

La figura 2 indica que una combinación de cambios en el sistema PANOX es necesario para la creación de esta nueva entidad sintética. En estos datos, la concentración de magnesio se encuentra en el rango deseado, aproximadamente de 11,3 mM. Salvo que se indique en la figura que la reacción contiene polietileno glicol (PEG) 8000, las reacciones contienen espermidina 1,5 mM y putrescina 1 mM y el uso de la mezcla de reacción descrita anteriormente para el nuevo sistema. Los datos se dan en dos grupos de tres. Los tres primeros resultados se han mejorado en un 33 mM de piruvato sódico. El segundo conjunto de datos es sin la adición de piruvato sódico. En ambos conjuntos de datos, el extracto que ha sido cultivado en 2YTPG produce mucha más proteína que el extracto cultivado en 2YT. Por otra parte, estos datos muestran que la eliminación de PEG 8000 es necesaria para el aumento de los rendimientos que ofrece esta nueva invención.

La figura 3 muestra la dependencia de la concentración de magnesio asociado con el nuevo entorno para la expresión de la proteína. La concentración óptima es de aproximadamente 11 mM. La composición de la mezcla de reacción es la descrita anteriormente para el sistema actual. En todos los casos, la síntesis se ha mejorado en 33 mM de piruvato sódico. Un perfil similar se ha medido para el nuevo entorno sin piruvato. La concentración de magnesio se ha reducido más de 2 veces de la mezcla de reacción estándar. Cuando el glutamato de magnesio se utiliza en la mezcla de reacción estándar, su valor óptimo es 23,3 mM y con acetato de magnesio, es 19,3 mM. La reducción de la concentración de magnesio es el tercer requisito para el nuevo entorno.

Además de los solutos que se agregan a la mezcla de reacción libre de células, también pueden ser incorporar sales en la reacción de la diálisis en el extracto. Concretamente, en el procedimiento tradicional para la preparación de extracto celular, la última etapa es la diálisis repetida para la composición iónica final en el extracto 10 mM Tris-(hidroximetil) aminometano (Tris, pH 8,2 con ácido acético glacial), 60 mM de acetato de potasio, y 14 mM de acetato de magnesio. Este procedimiento se utilizó para los experimentos descritos. Por lo tanto, en ausencia de sales exógenas, la reacción tiene una concentración inicial de aproximadamente magnesio 3,3 mM, potasio 14,4 mM, TRIS 2,4 mM, y acetato 23,5 mM, originarios del extracto celular. Todas las concentraciones indicadas incluyen la contribución de los componentes de extracto celular.

Los otros componentes de la mezcla de reacción se optimizan a través de diferentes gamas de concentraciones para crear un equilibrio general de los reactivos dentro de esta nueva entidad para la expresión de la proteína. El resultado es una nueva composición de reacción que extiende la duración de la síntesis de proteínas hasta seis horas (Figura 1) y que estabiliza la concentración de fosfato (Figura 4) y la reacción de pH (Figura 5) en el transcurso de la reacción de síntesis. Estas condiciones estables pueden contribuir a mejorar el plegamiento de las proteínas, así como una síntesis mejorada.

Este nuevo sistema ha demostrado también la primera evidencia de la activación de la fosforilación oxidativa en el sistema libre de células. La fosforilación oxidativa produce energía mediante el acoplamiento de la transferencia de electrones al oxígeno, un aceptor final de electrones, para la generación de ATP. Este proceso se utiliza para proporcionar energía de manera eficiente para las células que crecen aeróbicamente. La captura de este proceso a través de

esta invención es sustancialmente ventajosa para el sistema sin células, ya que ofrece un procedimiento muy eficaz de regeneración de energía *in vitro*. La activación de esta vía de generación de energía fue descubierta después de darse cuenta del rendimiento real, basado en las necesidades de energía para la producción de proteínas era de aproximadamente el 175% del rendimiento teórico máximo esperado utilizando piruvato como fuente de energía anaeróbica. Para referencia, el rendimiento de ATP para los sistemas PANOx y los convencionales de PEP es de aproximadamente el 50% y el 20% del máximo teórico, respectivamente.

Al tratar de comprender cómo se llevó a cabo este rendimiento, fueron probados los inhibidores de la fosforilación oxidativa para demostrar que este proceso fue parcialmente responsable de la capacidad de producción de la proteína de esta nueva tecnología. La figura 6 muestra los resultados de la síntesis de proteínas CAT con el nuevo sistema en tres condiciones distintas, con o sin 2-heptil-4-hidroxiquinoleína N-óxido (HQNO). HQNO inhibe la parte de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa. Todos los casos son reacciones de lotes de 20 μ l, y se incubaron a 37°C durante 5 horas. Los espacios delanteros de los reactores de procesamiento por lotes estaban llenos de oxígeno o argón, un gas inerte. Si la fosforilación oxidativa está activa, se esperaba que el rendimiento de la síntesis de proteínas deba disminuir con la adición del inhibidor de la fosforilación oxidativa, HQNO, en los casos donde el oxígeno está presente. Además, la síntesis de proteínas se ve afectada por la adición de HQNO en los casos en que está presente el argón y el oxígeno no está disponible.

Los datos en la figura 6 apoyan la conclusión de que la fosforilación oxidativa ha sido activada mediante el nuevo entorno. En presencia de oxígeno, la síntesis con el nuevo sistema, con o sin piruvato, disminuye considerablemente después de la adición HQNO, y no se ve afectado por HQNO en los casos de argón. Estudios similares se han llevado a cabo con los siguientes inhibidores de la fosforilación oxidativa: 2,4-dinitrofenol, cianuro, ácido, tenoiltrifluoracetona, y carbonilo-cianuro-m-clorofenilhidrazona. En todos los casos, los resultados apoyan nuestra conclusión de que el nuevo sistema ha activado la fosforilación oxidativa. Es importante señalar que los rendimientos de síntesis de proteínas en el sistema PANOx se ven afectados por estos mismos inhibidores.

Ejemplo 2

Efecto de un volumen de reacción de escala mayor

La síntesis de proteínas, utilizando los procedimientos de la invención, se realizó en una escala de 5 ml para la síntesis de cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en 10 ml un vaso de vidrio agitado. La expresión de CAT se determinó a partir de la incorporación de 14 C-leucina. Un pequeño trozo de alambre de acero inoxidable se pasa a través de una pieza de 30 cm de largo de tubo de silicona. Aproximadamente 15 centímetros del tubo (1,47 mm de diámetro, 1,96 mm de diámetro exterior) estaban sumergidos en la mezcla de reacción libre de células mediante bobinado en el interior del reactor. Este tubo se somete a presión con O₂ puro para suministrar el oxígeno necesario para la regeneración de ATP dentro de la célula sin la reacción de síntesis de proteínas. Se añadieron los sustratos consumidos/degradados en las siguientes concentraciones: 0,5 mM CTP, UTP 0,5 mM, 1,8 mM hidróxido de potasio, 0,5 mM asparagina, 0,5 mM glutamina, 2 mM cisteína, 1 mM serina, 10 mM glutamato de potasio, 0,05 mg/ml ARN polimerasa T7, y 0,007 mg/mL pK7CAT plásmido. La mezcla de aminoácidos contenía asparagina, glutamina, treonina, cisteína, serina, y glutamato. Se añadieron cada treinta minutos en la reacción de alimentación. UTP, CTP, hidróxido de potasio, ARN polimerasa T7 y 30 mM glutamato de potasio adicional se añadieron a las 1,2, 2,7, 4,2, y 6 horas. Se añadió pK7CAT en las 1,2 y 6 horas. Se añadió piruvato 33 mM a las 2,7 horas. Las barras de error representan los altos y bajos de dos experimentos independientes. El rendimiento total del CAT expresado fue monitorizado mediante la incorporación de 14 C-leucina. El rendimiento del CAT soluble expresado fue monitorizado mediante la incorporación de 14 C-leucina. El rendimiento activo de CAT se determinó mediante un ensayo enzimático de acuerdo con el protocolo de Shaw (1975) Meth Enzymol 43:737-755 (véase también la solicitud de patente 60/488.264) presentada al mismo tiempo.

Los datos se muestran en la figura 7. Este gráfico muestra la síntesis de aproximadamente 100 nanomoles de proteína activa en una sola reacción con los procedimientos de la invención utilizados en operación de alimentación por lotes. Estos procedimientos, por lo tanto, han demostrado ser útiles para la producción conveniente y económica de grandes cantidades de proteínas, por ejemplo, en cantidades suficientes para el análisis de la estructura de NMR, para los ensayos preclínicos y clínicos, y similares.

Ejemplo 3

Efecto de cofactores

Se realizaron reacciones de síntesis de proteínas tal como se describe en el Ejemplo 1 para el sistema Cytomim. Se realizaron reacciones de 15 μ l durante 6 horas, expresando CAT. El error representa la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una "x" indica la presencia de ese componente. La producción de proteínas se da en relación con un control con NAD y CoA. Las reacciones de control (con NAD y CoA) produjeron 727 μ g CAT/ml.

La concentración de los cofactores CoA y NAD se varió tal como se indica en la tabla 2. Tal como se desprende mediante la producción relativa de proteínas, la eliminación de CoA no tuvo ningún efecto significativo. La supresión de NAD reduce la síntesis en un 10% aproximadamente.

TABLA 2

Proteína expresada	0,33 mM NAD	0,26 mM CoA	Producción Relativa de Proteínas
CAT	x	X	1 0,03
CAT		X	0,91 0,05
CAT	x		1,02 0,1
CAT			0,86 0,03

Ejemplo 4

Síntesis de activador del plasminógeno tisular

Elucidar las condiciones adecuadas para el correcto plegamiento de las proteínas complejas es un problema central en la expresión libre de células. Aunque los sistemas *in vitro* han tenido éxito en el plegado eficiente de varias proteínas de modelo específico que requieren pocas o ninguna enlace de disulfuro, tales como CAT, lograr el correcto plegamiento de las proteínas complejas ha sido desafiante. La presente invención proporciona un entorno que es más adecuado para la producción de proteínas complejas plegadas adecuadamente, en estado activo. El activador tisular del plasminógeno (tPA) es un complejo de proteínas de mamíferos. El dominio activo de esta proteína, llamada V-PA, contiene el dominio de proteasa y un dominio Krinkle. V-tPA contiene 9 enlaces de disulfuro.

Se establecieron reacciones de síntesis de V-tPA en los sistemas PANOx y Cytomim, tal como se describe en el ejemplo 1. Como el vtPA requiere un ambiente oxidante, el extracto de células fue tratado con yodoacetamida 1 mM (IAM) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de ser añadido a la mezcla de reacción celular gratis. Además, estas reacciones incluyeron 75 mg/ml DsbC, 4 mM de glutatona oxidada (GSSG) y 1 mM de glutatona reducida (GSH). El tratamiento de IAM fue descrito por Swartz y Kim, patente US no. 6.548.276.

El protocolo de ensayo de actividad para vtPA se indica a continuación. Los ensayos de actividad se realizaron inmediatamente después de la reacción PANOx de 3 horas o una reacción de 6 horas con el nuevo entorno. Después de centrifugar las muestras a 4°C, 15000 rcf durante 15 minutos, se tomó 10 µl del sobrenadante y se añadió a un pozo en una microplaca. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón de mezcla de reactivos de ensayo (9 partes de tampón Tris y 1 parte de solución t-PA Chromozym; tampón Tris: tampón Tris-Cl 100 mM pH 8,5 y 0,15% (w/v) de Tween 80; solución t-PA Chromazym: 4 mM Chromazym t-PA en agua redestilada, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) como agregado y se mezclaron con la muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos. El índice de cambio en la absorbancia a 405 nm fue registrado en un lector de microplacas (SpectralMax 190, Molecular Devices, CA) mediante ensayos cinéticos. La concentración de la muestra se calculó por comparación con un estándar de vtPA.

Aunque aproximadamente la misma cantidad de proteína total fue producida mediante los sistemas PANOx y Cytomim, la cantidad de activos v-tPA se duplicó utilizando el nuevo sistema en comparación con la mezcla de reacción estándar. (Tabla 1)

TABLA 1

	v-tPA total (mg/mL)	v-tPA activo (mg/mL)
Sistema Cytomim	232	44,8
Sistema PANOx	211	22,7

Ejemplo 5

Concentraciones de espermidina y putrescina

Se establecieron reacciones de síntesis de proteínas tal como se describe en el Ejemplo 1 para el sistema Cytomim. Se realizaron reacciones de 15 μ l durante 6 horas, expresando CAT. Las concentraciones de espermidina y putrescina fueron variadas tal como se indica en la Tabla 3. La espermidina se ha optimizado con respecto a la producción de proteínas en presencia de 1 mM putrescina y la putrescina en la presencia de 1,5 mM espermidina.

TABLA 3

Soluto iónico	Optimización del perfil (mM/fracción de rendimiento máximo)*					
Nuevo Sistema						
Espermidina	0/0.53	0.5/0.90	1/0.97	1.5/1.00	5/0.48	10/0.15
Putrescina	0/0.95	1/1.00	3/0.80	7/0.58	11/0.43	15/0.23
* Los valores dados como "1/0,97" indican que una concentración 1 mM de soluto iónico se añadió a la reacción y que el 97% de la máxima expresión de CAT se logró en esa concentración en particular. Sólo un soluto se varió a la vez. Todos los otros solutos eran en las concentraciones que se describen en el Ejemplo 1 para el nuevo sistema.						

Ejemplo 6

Comparación de la síntesis de proteínas

La cantidad de proteínas producidas en el medio Cytomim se mejora sustancialmente respecto a los sistemas anteriores. Tal como se muestra en la figura 8, el sistema Cytomim produce un mayor rendimiento total, así como una mayor producción de proteína soluble y activa.

Se realizaron reacciones durante 6 horas y se determinó la expresión CAT a partir de la incorporación de ^{14}C -leucina y el ensayo de actividad enzimática. Se prepararon mezclas de reacción de 15 μ l en un tubo diferente para cada punto del tiempo. En cada momento, un tubo fue sacrificado con el fin de determinar la cantidad de proteína expresada. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes para el sistema PANOX con piruvato y seis experimentos individuales para el sistema Cytomim. Cuadrados: sistema Cytomim; Abierto, producción total de CAT expresada como un seguimiento mediante incorporación de ^{14}C -leucina; Grises, rendimiento soluble de CAT expresado mediante seguimiento por incorporación de ^{14}C -leucina; Cerrado, rendimiento de activos de CAT, determinado mediante ensayo enzimático. Triángulos grises, sistema PANOX utilizando piruvato como fuente de energía, producción total de CAT expresada como un seguimiento mediante incorporación de ^{14}C -leucina.

Además de los rendimientos significativos, esta nueva tecnología ofrece una ventaja económica respecto a los sistemas convencionales libres de células. Los compuestos de fosfato de alta energía que se utilizan convencionalmente para regenerar ATP generalmente tienen un costo asociado con la expresión libre de células más caro. El sistema Cytomim puede eliminar casi por completo este costo. Rendimientos de proteínas equivalentes o mayores en una fracción del costo hacen el sistema Cytomim un procedimiento muy atractivo para la síntesis de proteínas libres de células.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6337191 B1 [0007]
- 5 • US 6548276 B [0021] [0069]
- US 60488264 B [0064]

Documentos no relacionados con la patente citados en la descripción

- 10 • **Spirin** *et al. Science*, 1988, vol. 242, 1162-1164 [0005]
- **Kim; Swartz. Biotechnol Bioeng.**, 2001, vol. 74, 309-316 [0006]
- 15 • **Kim; Swartz. Biotechnol Bioeng.**, 1999, vol. 66, 180-188 [0006]
- **Kim; Swartz. Biotechnol Prog.**, 2000, vol. 16, 385-390 [0007]
- 20 • **Kim; Swartz. Biotechnol Lett.**, 2000, vol. 22, 1537-1542 [0007]
- **Kim; Choi. J Biotechnol**, 2000, vol. 84, 27-32 [0007]
- **Kim et al. Eur J Biochem.**, 1996, vol. 239, 881-886[0007]
- 25 • **Muller; Blobel. In vitro** translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *PNAS*, 1984, vol. 81, 7421-7425 [0037]
- Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. **Pratt, J.M.** Transcription and translation: a practical approach. *IRL Press*, 179-209 [0053]
- 30 • **Davanloo et al.** Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, vol. 81, 2035-2039 [0053]
- **Shaw. Meth Enzymol**, 1975, vol. 43, 737-755 [0064]

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de reacción para transcripción *in vitro* de ARNm y/o la traducción de polipéptidos, comprendiendo la mezcla:

un extracto de células bacterianas crecido en medio que contiene glucosa y que comprende vesículas de membrana invertida que contienen componentes de la cadena respiratoria y el F_1F_0 ATPase; componentes de maquinaria de síntesis de polipéptidos y/o ARNm; una plantilla para la transcripción de dicho ARNm y/o la traducción de dicho polipéptido; nucleótidos y/o aminoácidos para la síntesis de dicho ARNm y/o polipéptidos; y cofactores, enzimas y otros reactivos necesarios para dicha transcripción y/o traducción;

en la que dicha mezcla de reacción está prácticamente exenta de polietileno glicol; comprende magnesio en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM y comprende uno o más de espermina, espermidina y putrescina;

en la que la mezcla de reacción proporciona condiciones que permiten la transcripción *in vitro* de ARNm y/o traducción de polipéptidos; y la activación de la fosforilación oxidativa, que es sensible a inhibidores de la cadena de transporte de electrones.

2. Mezcla de reacción según la reivindicación 1, en la que los componentes son capaces de utilizar una plantilla de ARNm para sintetizar un polipéptido.

3. Mezcla de reacción según la reivindicación 1, en la que los componentes son capaces de utilizar una plantilla de ADN para sintetizar ARNm.

4. Mezcla de reacción según la reivindicación 1, en la que dicho extracto biológico libre de células comprende un extracto de *E. coli* crecido en medio que contiene glucosa.

5. Mezcla de reacción según la reivindicación 4, en la que dicho *E. coli* se cultiva en medio que contiene glucosa y fosfato.

6. Procedimiento para la transcripción *in vitro* de ARNm y/o la traducción de polipéptidos, comprendiendo el procedimiento:

sintetizar dicho ARNm y/o polipéptidos en una mezcla de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha transcripción de ARNm y/o traducción de polipéptidos es por lo menos tres veces superior a la síntesis en la ausencia de dicho fosforilación oxidativa.

8. Procedimiento según la reivindicación 6, en la que dicha síntesis de macromoléculas biológicas se realiza como una reacción de lotes o una reacción continua.

9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido comprende al menos un enlace de disulfuro.

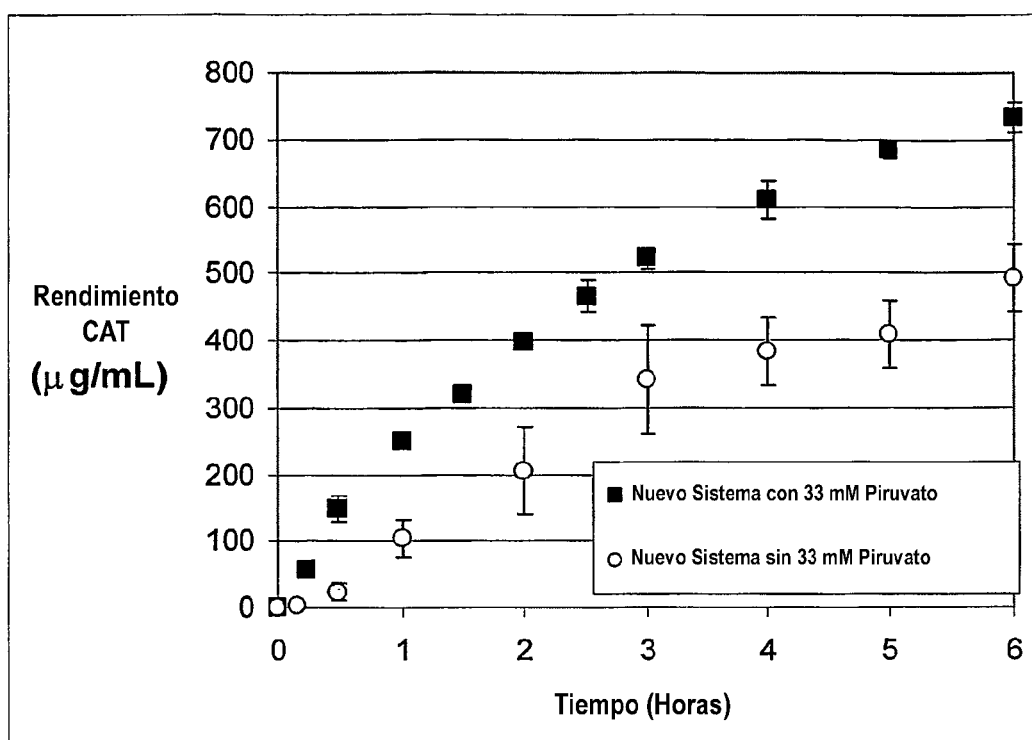
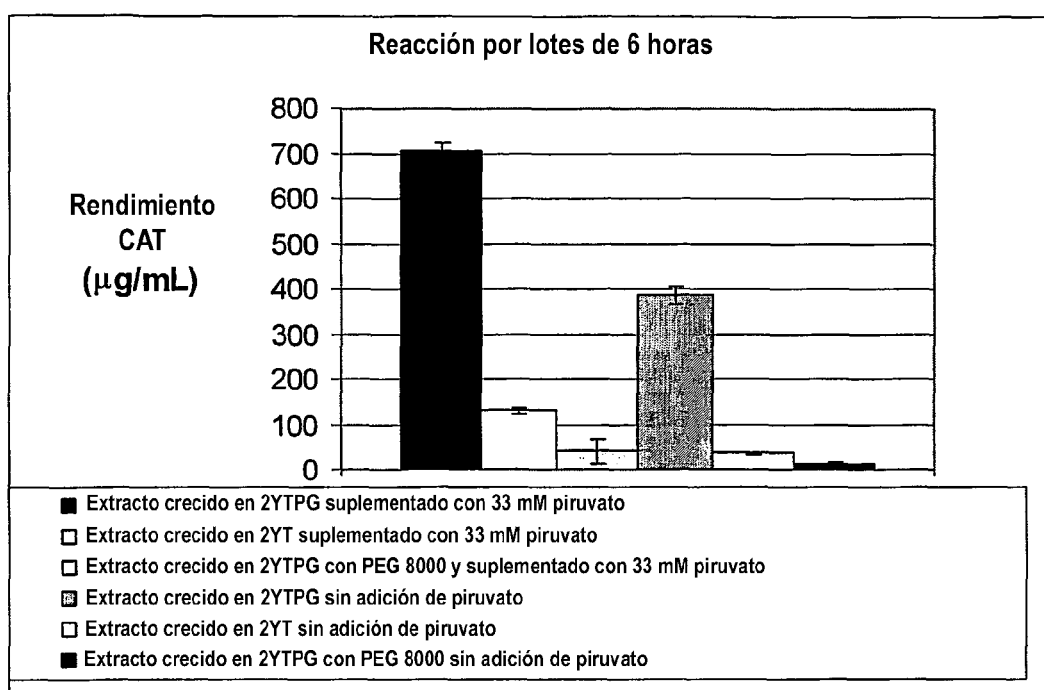


Figura 1

FIGURA 2



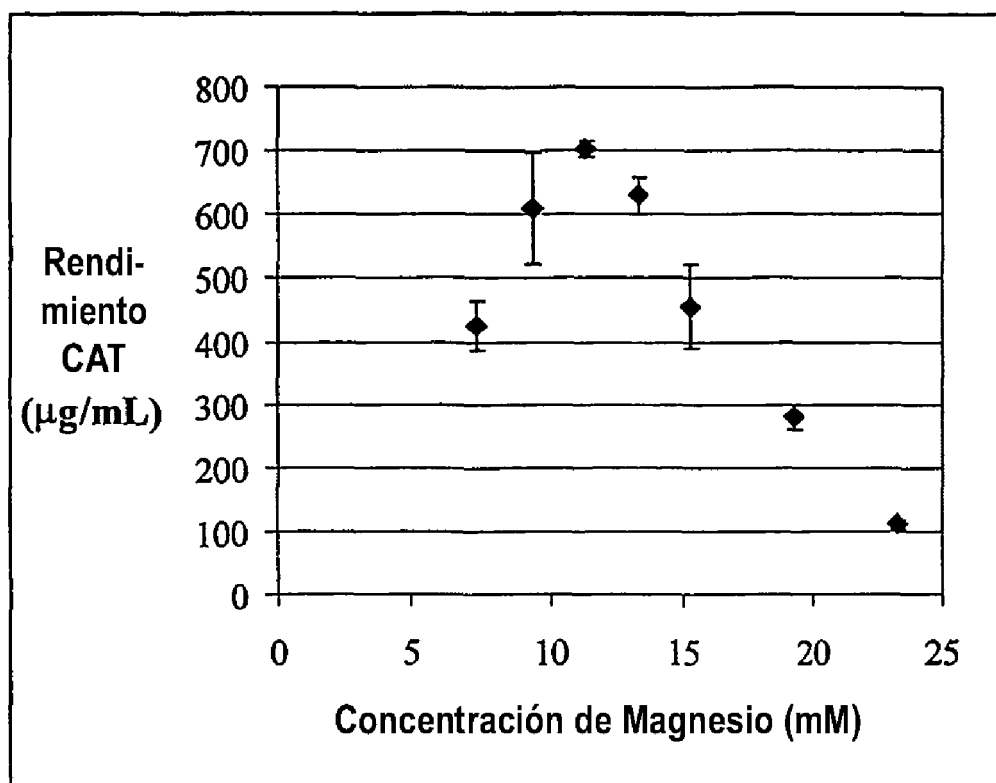
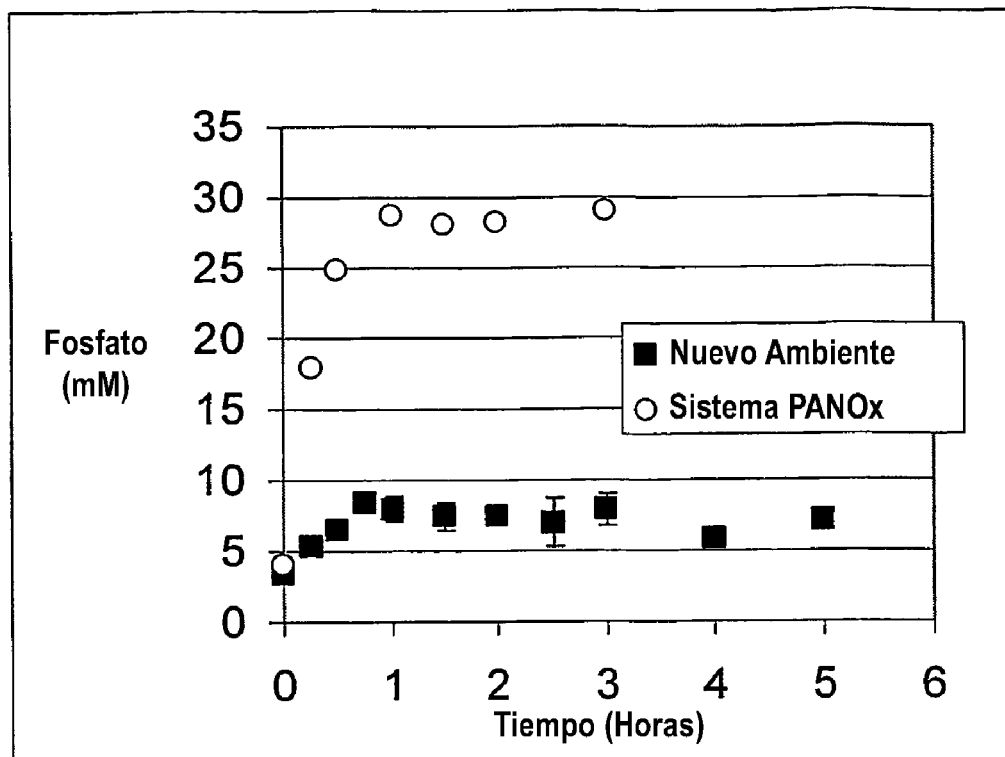


Figura 3

FIGURA 4



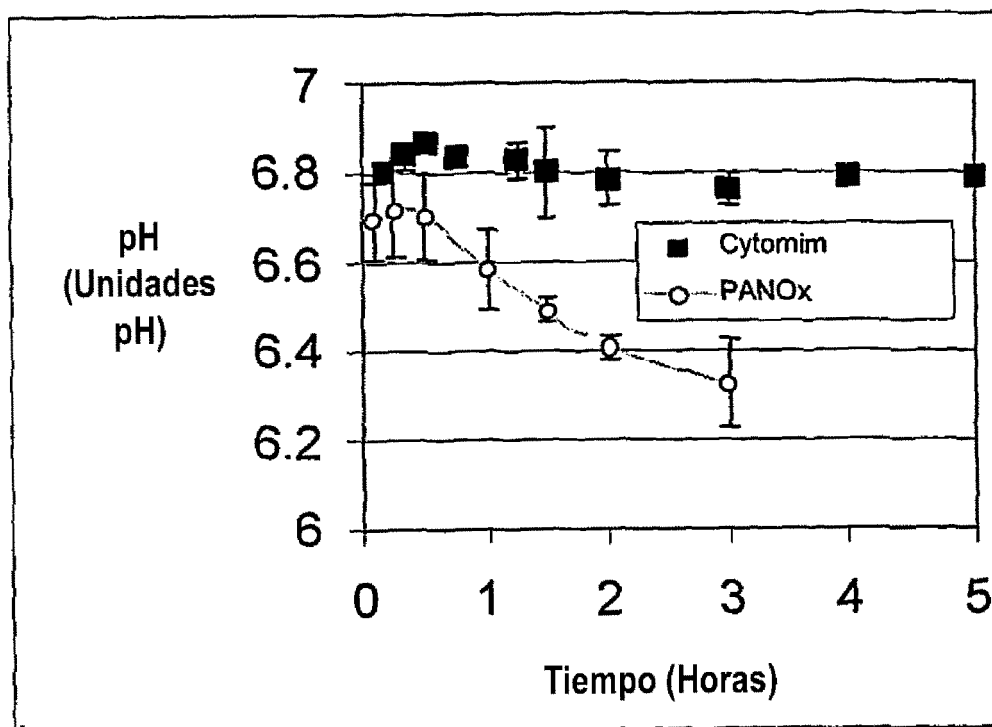
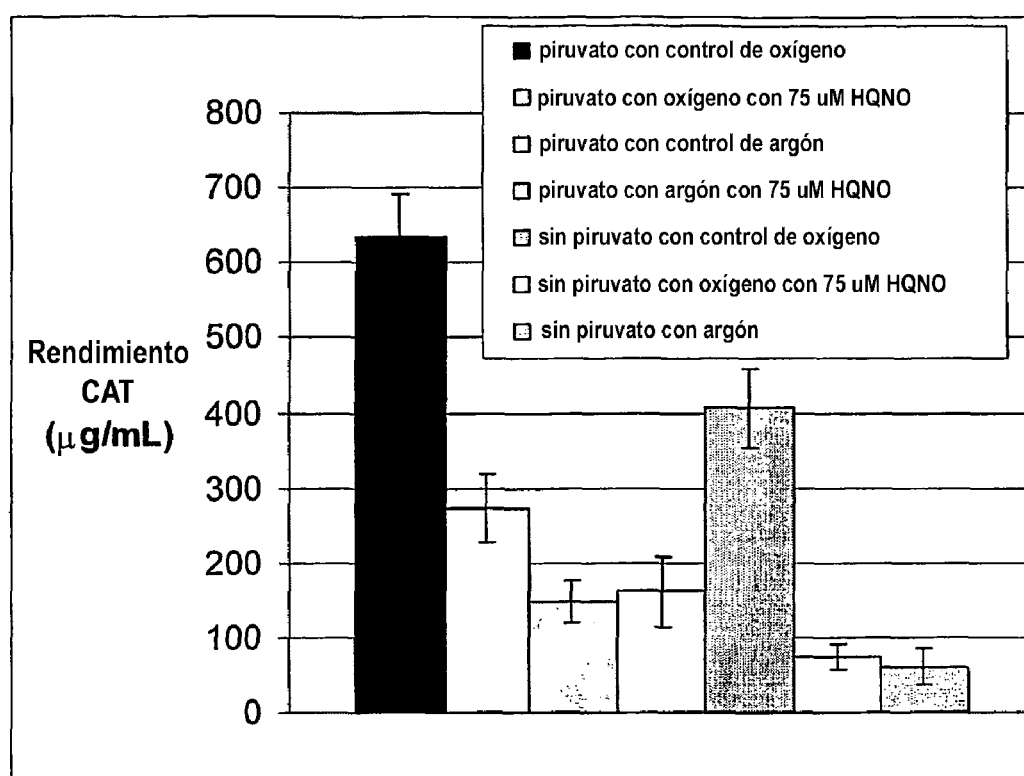


FIGURA 5

FIGURA 6



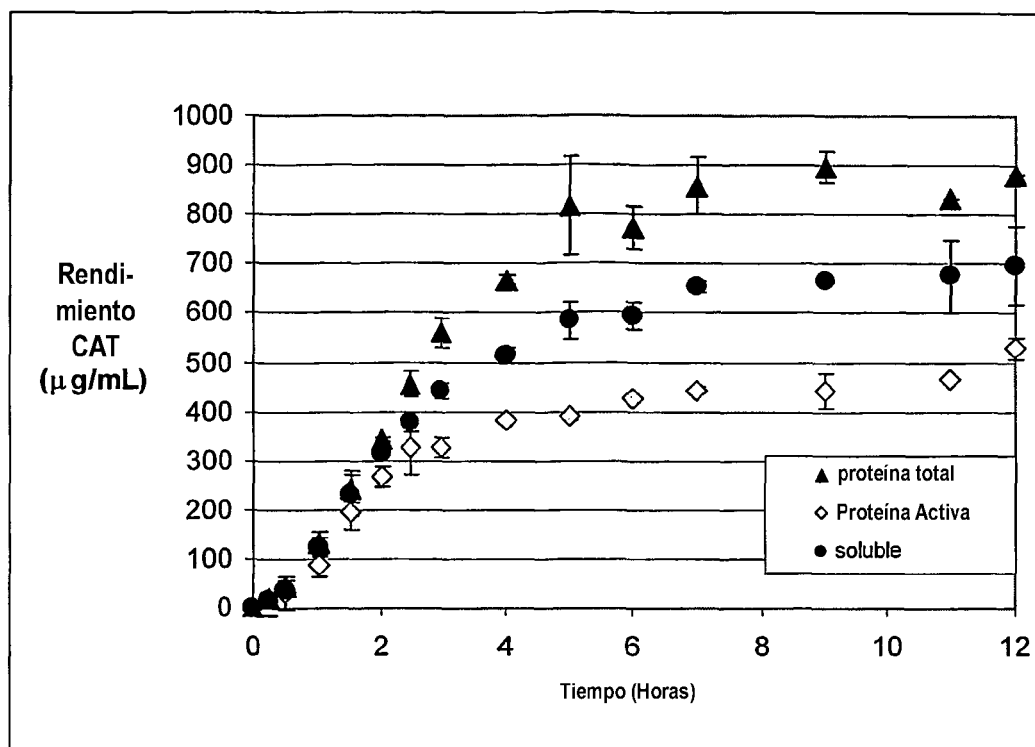
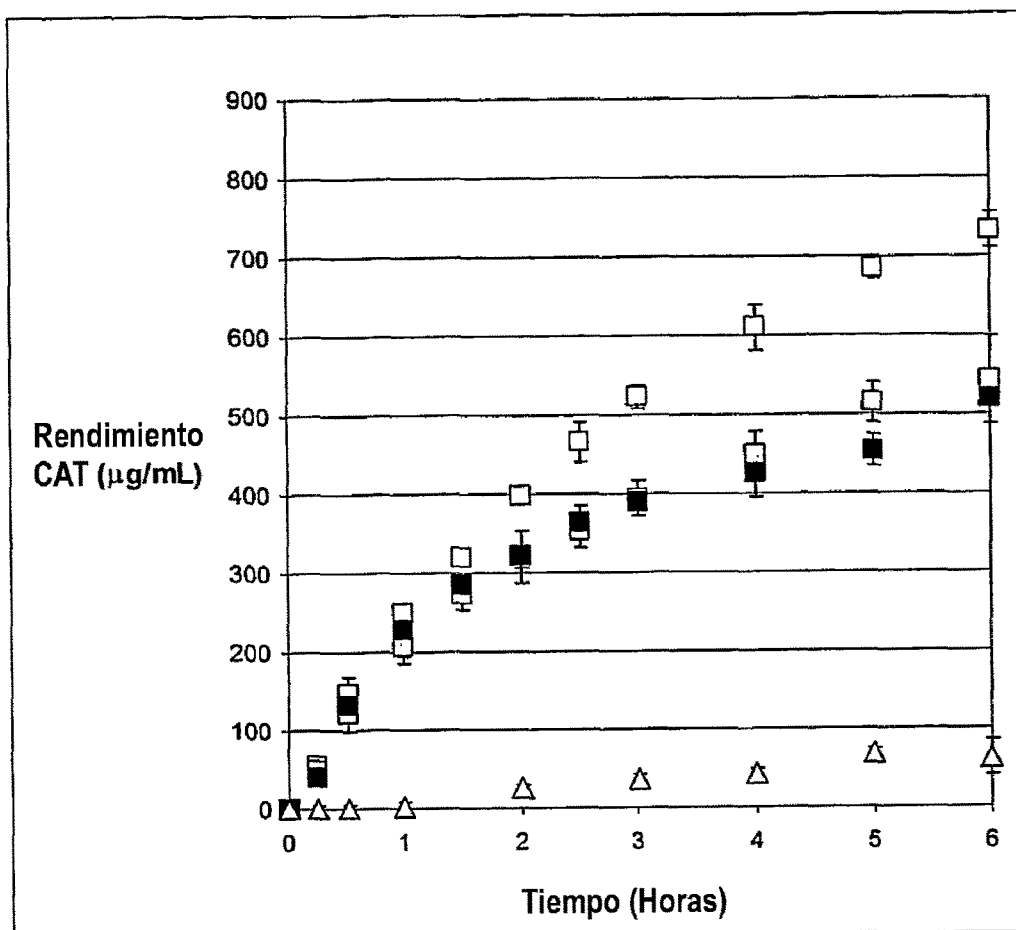


Figura 7



- Sistema Cytomim, rendimiento total
- Sistema Cytomim, rendimiento soluble
- Sistema Cytomim, rendimiento de proteína activa
- △ Sistema PANOx, fuente de energía piruvato, rendimiento total

FIGURA 8