



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 191 064**

51 Int. Cl.:
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **95935557 .9**
86 Fecha de presentación : **25.10.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **0736605**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.1996**

54 Título: **Procedimiento para producir proteínas.**

30 Prioridad: **25.10.1994 JP 6-260728**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.09.2003**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.02.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.02.2008**

73 Titular/es: **Mitsubishi Pharma Corporation**
6-9, Hiranomachi 2-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0046, JP

72 Inventor/es: **Kobayashi, Kaoru;**
Tomomitsu, Kenji;
Kuwae, Shinobu;
Ohya, Tomoshi;
Ohda, Toyoo y
Ohmura, Takao

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 191 064 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir proteínas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de una proteína, que comprende controlar la velocidad de adición de un sustrato a un medio durante el proceso de cultivo para conseguir una producción eficaz de la proteína. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de producción eficaz de una proteína, que comprende
10 controlar la velocidad de adición de un sustrato a un medio para optimizar el entorno de cultivo de un sistema de cultivo discontinuo alimentado mediante la utilización de la velocidad específica de multiplicación μ como índice.

Antecedentes de la técnica

15 La mayoría de las proteínas con un valor comercial se producen actualmente mediante cultivo de una célula anfitriona capaz de expresar el gen de tal proteína.

La producción de una proteína mediante técnicas de cultivo o recombinación genética se basa en el mecanismo que permite la producción de una proteína deseada junto con la proliferación funcional exponencial de la célula anfitriona. Para aumentar la productividad de la proteína, se necesita preparar o controlar el entorno de cultivo de la
20 célula anfitriona, de tal manera que la actuación de la célula anfitriona (función de la célula) pueda ser empleada lo más eficazmente posible. Con este fin, se han investigado diversos métodos adecuados para la producción por cultivo referidos a procesos de cultivo para producir una proteína deseada en un tiempo corto, con una eficacia de producción alta y con un rendimiento alto.

25 Existe una relación estrecha entre la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona y la cantidad de proteína producida por la mencionada célula anfitriona, y la producción máxima de la proteína requiere un control de la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona para mantenerse constante a un valor óptimo. Para conseguir esto, hasta ahora se ha estudiado desde varios aspectos la relación entre la cantidad de producto producido por la célula anfitriona (microorganismo) y la velocidad específica de multiplicación de la misma, lo que ha conducido
30 a sugerir numerosos modelos.

De acuerdo con esos modelos, algunas veces la velocidad específica de multiplicación de la célula debe variarse al menos una vez durante el cultivo para aumentar la producción [*Hakko KogakuKaishi*, vol. 70, N° 5, pp. 395-404
35 (1992)].

Sin embargo, los estudios realizados por los presentes inventores revelaron, en primer lugar, que la variación de la velocidad específica de multiplicación con el fin de optimizar el cultivo no conduce a un aumento de la producción del producto objetivo en el grado deseado (Ejemplo 1 de la presente memoria descriptiva).
40

Por ello, se demanda un método de cultivo para aumentar la productividad del producto deseado producido por la célula anfitriona, que sea capaz de producir eficazmente el producto sin afectar a la actuación de la célula anfitriona debido a cambios en la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona.

45 Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un método de producción de una proteína que comprende controlar, en un sistema de cultivo discontinuo alimentado, la velocidad específica de multiplicación μ de la célula anfitriona mediante el cambio de la velocidad de alimentación del sustrato dentro del medio, para producir así la proteína deseada en grandes cantidades y en un tiempo corto.

50 Otro aspecto de la presente invención trata de proporcionar un método de cultivo de la célula anfitriona capaz de producir la proteína deseada de una manera altamente eficaz.

Descripción de la invención

55 Los presentes inventores han investigado la relación entre la velocidad de alimentación del sustrato dentro de un cultivo discontinuo alimentado y la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona. Además, se ha investigado la relación entre la velocidad de alimentación y la cantidad de producto objetivo producido (proteína), para encontrar un método para ajustar o controlar la velocidad específica de multiplicación μ de la célula anfitriona al valor óptimo (valor objetivo) sin control de la respuesta. Los autores de la invención han encontrado que la variación
60 continua de la velocidad de alimentación del sustrato dentro del medio durante el cultivo, con el fin de cambiar la velocidad específica de multiplicación μ de la célula, conduce a un aumento de la productividad del producto objetivo sin ejercer una influencia adversa sobre la función de la célula o la producción del producto objetivo.

Esto es, la presente invención proporciona un método para producir una proteína deseada que comprende hacer
65 que se multiplique, mediante cultivo discontinuo alimentado, una célula anfitriona capaz de expresar la mencionada proteína, en el que la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona se cambia desde la velocidad inicial a una predeterminada mediante el cambio continuo de la velocidad de adición del sustrato que controla la multiplicación de la célula anfitriona y en el que el periodo de tiempo durante el cual se mantiene la velocidad de

multiplicación específica inicial se determina a partir de la relación entre la velocidad específica de multiplicación y la velocidad específica de producción. Preferiblemente la célula anfitriona expresa constitutivamente la proteína deseada o expresa la proteína deseada cuando la célula anfitriona se cultiva en presencia de un inductor.

5 Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 muestra los cambios de la velocidad de adición de metanol a un medio a lo largo del tiempo (Ejemplo 1).

La Fig. 2 muestra los cambios de la velocidad específica de multiplicación μ en el sistema a lo largo del tiempo (la presente invención), que incluye los cambios continuos de la velocidad de adición de metanol [Figura (a)], y los cambios a lo largo del tiempo de la velocidad específica de multiplicación μ en el sistema (control ①), que incluye un cambio instantáneo de la velocidad de adición de metanol [Figure (b)].

La Fig. 3 muestra una comparación de la densidad de células que se multiplican en el sistema en el que la velocidad de adición de metanol se cambia de manera continua (la presente invención, - Δ -) y en el sistema en el que la velocidad mencionada se cambia instantáneamente (control ①, - $\bullet$ -).

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, la “expresión constitutiva de la proteína deseada” significa que la proteína deseada se expresa constantemente, independientemente de las condiciones de multiplicación de la célula anfitriona.

En la presente invención, además, “la expresión sustancialmente constitutiva de la proteína deseada cuando la célula anfitriona puede proliferar mediante un inductor” significa que hay alguna relación entre las condiciones de multiplicación de la célula anfitriona y la expresión de la proteína, y cuando la sustancia necesaria para la proliferación de la célula anfitriona y el inductor son iguales, la proliferación de la célula anfitriona y la expresión de la proteína deseada suceden simultáneamente.

Tal como se utiliza aquí, “un inductor” se refiere a una sustancia que inicia la transcripción y la traducción del gen que codifica la proteína deseada, que se ejemplifica con metanol, galactosa y sacarosa.

Ejemplos de “célula anfitriona capaz de expresar la proteína deseada” (de aquí en adelante denominadas brevemente “células anfitrionas”) que serán utilizadas en la presente invención incluyen células naturales y células mutadas capaces de producir una proteína extraña (de aquí en adelante también denominadas de manera apropiada “células transformadas”).

El origen de la célula anfitriona no está limitado particularmente, y la célula anfitriona se ejemplifica con microorganismos tales como bacterias (e.g., las que pertenecen al género *Escherichia* y las que pertenecen al género *Bacillus*) y levaduras (e.g., el género *Saccharomyces* y el género *Pichia*). De manera específica, el género *Escherichia* incluye, por ejemplo, *Escherichia coli* (de aquí en adelante *E. coli*) K12DH1, M103, JA221, HB101, X600, XL-1 Blue y JM109. El género *Bacillus* incluye, por ejemplo, *Bacillus subtilis* MI114 y 207-21. Las levaduras incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R⁻, NA87-11A y DKD-5D y *Pichia pastoris*. Nótese que el origen no está limitado a los ejemplos mostrados arriba. De estos, se prefieren las levaduras.

Cuando una levadura se utiliza como célula anfitriona, puede ser una levadura metilotrófica. Ejemplos de levaduras metilotróficas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las levaduras que pertenecen al género *Hansenula* o el género *Pichia*, que son capaces de multiplicarse en metanol [The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)]. Se prefieren levaduras metilotróficas que pertenecen al género *Pichia*, tales como la auxotrófica *Pichia pastoris* GTS115 (NRRL Y-15851), *Pichia pastoris* GS190 (NRRL Y-18014), *Pichia pastoris* PPF1 (NRRL Y-18017), y la cepa de *Pichia pastoris* salvaje (NRRL Y-11430, NRRL Y-11431).

Preferiblemente las células anfitrionas incluyen, por ejemplo, células transformadas capaces de producir una proteína deseada heteróloga de la célula anfitriona (de aquí en adelante denominada “proteína heteróloga” de manera apropiada). Tales células tienen un ADN extraño que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína heteróloga, y expresan y producen la proteína heteróloga deseada de acuerdo con los códigos de ADN mencionados. El método para obtener la célula no está limitado particularmente. Por ejemplo, la célula puede obtenerse utilizando la técnica del ADN recombinante mediante transformación con un plásmido o fago que porta el ADN que codifica la proteína deseada.

Un ejemplo específico de célula anfitriona en el sentido de la presente invención es una célula anfitriona que produce HSA. La preparación de esta célula y la expresión y producción de HSA utilizando la mencionada célula puede ser llevada a cabo mediante un método conocido o un método de acuerdo con el método conocido.

Ejemplos específicos del método incluyen un método que utiliza un gen de albúmina de suero humano conocido (Publicación no examinada de las Patentes Japonesas N° 56684/1983, 90515/1983 y 150517/1983), un método que utiliza un gen nuevo de albúmina de suero humano (Publicación no examinada de las Patentes Japonesas N° 29985/1987 y 98486/1989), un método que utiliza una secuencia de señales sintéticas (Publicación no examinada de la Patente Japonesa N° 240191/1989), un método que utiliza una secuencia de señales de albúmina de suero (Publicación no exa-

minada de la Patente Japonesa Nº 167095/1990), un método que comprende integrar un plásmido recombinante en un cromosoma (Publicación no examinada de la Patente Japonesa Nº 72889/1991), un método que comprende la fusión de receptores (Publicación no examinada de la Patente Japonesa Nº 53877/1991), un método que comprende la mutación en un medio que contiene metanol, un método que utiliza un promotor del mutante AOX₂ (Publicación no examinada de la Patente Japonesa Nº 299984/1992), un método que comprende la expresión de HSA por el *Bacillus subtilis* (Publicación no examinada de la Patente Japonesa Nº 25133/1987), un método que comprende la expresión de HSA por una levadura (Publicación no examinada de las Patentes Japonesas Nº 41487/1985, 39576/1989 y 74493/1989) y un método que comprende la expresión de HSA mediante una levadura *Pichia* (Publicación no examinada de Patente la Japonesa Nº 104290/1990).

La proteína que puede ser la diana del método de la presente invención no está limitada particularmente, y puede ser cualquier proteína tal como una proteína constitutiva de la célula anfitriona natural mencionada anteriormente, la cual se produce de este modo, y una proteína extraña producida por células transformadas.

Ejemplos específicos de la proteína constitutiva de la célula anfitriona incluyen ARN-polimerasa, actina, y enzimas involucradas en el sistema respiratorio o el sistema de glicolisis; y ejemplos de la proteína heteróloga incluyen interferón, uroquinasa, prouroquinasa, t-PA (activador plasminógeno del tejido), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), HSA (albúmina de suero humano), IGF (factor de crecimiento de tipo insulina) e inhibidor de tripsina urinaria (UTI), con preferencia dada a HSA, interferón, uroquinasa, prouroquinasa, IGF y UTI, y más preferencia dada a HSA.

La combinación de la célula anfitriona y la proteína heteróloga no está sujeta a una limitación particular y pueden combinarse de la manera conveniente. Algunos ejemplos son la combinación de *Escherichia coli* e interferón, la de *Saccharomyces cerevisiae* y prouroquinasa, la de *Saccharomyces cerevisiae* y HSA, y la de *Pichia pastoris* y HSA.

La célula anfitriona (célula transformada) puede ser cultivada mediante cultivo discontinuo alimentado en un medio que contiene diversas fuentes de energía de carbono y/o nutrientes. Esto es, una célula anfitriona se cultiva durante un cierto periodo en un medio (medio primario) que contiene diversas fuentes de energía de carbono y/o nutrientes adecuados para su proliferación y, después de un cierto punto en el tiempo, el sustrato que controla la proliferación de la célula anfitriona se añade al mencionado medio, y el cultivo se completa sin retirar la proteína objetivo del sistema (Publicación no examinada de la Patente Japonesa Nº 83595/1991).

El “sustrato que controla la proliferación de la célula anfitriona” en la presente invención significa un sustrato adecuado para la proliferación de la célula anfitriona, que puede ser preferiblemente una fuente de energía de carbono.

Como ejemplos de sustratos se incluyen metanol, glicerina, sorbitol, glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, que pueden ser utilizados a solas o en combinación.

Como ejemplos de sustratos preferidos para ser utilizados cuando se emplea *Pichia pastoris* como célula anfitriona se incluyen metanol, glicerina, y combinaciones de ellos. Como ejemplos de sustratos preferidos para ser utilizados cuando se emplea *Saccharomyces cerevisiae* como célula anfitriona se incluyen galactosa y sacarosa, y como ejemplos de sustratos para ser utilizados cuando se emplea *Escherichia coli* como célula anfitriona se incluye lactosa.

La forma del sustrato que se añade al medio puede ser la del propio sustrato, o la de una composición que incluya otros componentes tales como vitaminas y sales inorgánicas. Cuando se añade, el sustrato puede ser sólido, polvo, granulado, líquido o en cualquier otra forma, dando preferencia a la de líquido, que puede disolverse rápida y uniformemente en el medio.

Las diversas fuentes de energía de carbono y/o nutrientes que serán utilizados para el cultivo primario de las células anfitrionas son fuentes de energía de carbono y/o nutrientes conocidos que son adecuados para el cultivo de la célula anfitriona. Ejemplos de fuentes de energía de carbono incluyen glucosa y glicerina, y ejemplos de nutrientes incluyen fuentes de nitrógeno (e.g., extracto de levadura, bactopectona, casaminoácidos, amoníaco, fosfato amónico y acetato amónico), fuentes de fosfato (e.g., ácido fosfórico y fosfato amónico), fuentes inorgánicas y otros elementos en trazas (e.g., hierro, zinc, cobre, magnesio, manganeso, calcio, molibdeno y cobalto), y vitaminas (e.g., biotina, ácido pantoténico y tiamina).

La “variación continua de la velocidad de adición del sustrato” en la presente invención significa cambiar continuamente la velocidad de adición del sustrato al tanque de cultivo sin interrupción. En consecuencia, la velocidad específica de multiplicación μ de la célula anfitriona cambia moderadamente desde la velocidad inicial hasta una velocidad predeterminada.

La “velocidad específica de multiplicación μ de la célula anfitriona” en la presente invención significa la cantidad de proliferación de célula anfitriona por unidad de tiempo (h) y cantidad de célula unidad, que se expresa generalmente mediante la fórmula siguiente:

$$\mu = \frac{1}{XV} \times \frac{\Delta XV}{\Delta t}$$

donde X es la densidad de células (g/L), V es la cantidad de medio (L), t es el tiempo de cultivo (h), y ΔXV y Δt son los incrementos de XV y t, respectivamente.

Cambiar la velocidad específica de multiplicación μ de la célula anfitriona desde la velocidad inicial hasta una velocidad predeterminada en la presente invención significa cambiar la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona a un valor diferente, predeterminado durante el cultivo discontinuo alimentado. La velocidad específica de multiplicación inicial preferible, la velocidad específica de multiplicación predeterminada y el momento del cambio (i.e., el periodo de tiempo durante el cual la velocidad específica de multiplicación inicial se mantiene) puede determinarse a partir de la relación entre la velocidad específica de multiplicación μ y la velocidad de producción específica ρ [*Hakko KogakuKaishi*, vol. 70, N° 5, pp. 395-404 (1992)].

La velocidad de producción específica ρ aquí significa el incremento de la cantidad de producción de la proteína por unidad de tiempo (h) y cantidad unitaria de célula, que se expresa generalmente mediante la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{1}{XV} \times \frac{\Delta PV}{\Delta t}$$

donde P es la cantidad de proteína producida (g/L), X es la densidad de células (g/L), V es la cantidad de medio (L), t es el tiempo de cultivo (h), y ΔPV y Δt son los incrementos de PV y t, respectivamente.

La velocidad específica de multiplicación puede cambiarse más de una vez.

La temperatura de cultivo que debe ser utilizada en la presente invención es preferiblemente adecuada para la proliferación de la célula anfitriona y la producción de la proteína deseada, la cual varía dependiendo de la célula anfitriona que se cultiva. Cuando la célula anfitriona es *Escherichia coli*, la temperatura es 20-46°C, preferiblemente 36-38°C; cuando es una levadura, la temperatura es alrededor de 20-35°C, preferiblemente alrededor de 23-30°C; y cuando es *Bacillus subtilis*, la temperatura es 28-40°C, preferiblemente 36-38°C.

El pH del medio se puede ajustar a un valor adecuado para la proliferación de la célula anfitriona y la producción de la proteína deseada, el cual varía dependiendo de la célula anfitriona que se cultiva. El contenido de oxígeno disuelto de la cuba de cultivo se selecciona apropiadamente dentro del intervalo de aproximadamente 10-70% de la saturación.

La presente invención se describe a continuación con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos y los Ejemplos de Referencia, que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplo 1

El HSA se produjo en un sistema de cultivo que comprende un cambio de la velocidad específica de multiplicación μ de la cepa UHG42-3 de la levadura *Pichia*, capaz de expresar y producir HSA desde la velocidad específica de multiplicación inicial $\mu' = 0,025$ hasta una velocidad específica de multiplicación predeterminada $\mu'' = 0,002$, y estando descrita la preparación de la cepa en una Publicación no examinada de la Patente Japonesa N° 29984/1992. En concreto, el cultivo comprendió las siguientes etapas:

(1) Método de cultivo

① Precultivo

La cepa se precultivó en un caldo de YPD (2% bactopectona, 1% extracto de levadura, 2% glucosa). En concreto, se inoculó 1 ml de una suspensión de células ($OD_{540} = 10$) de levadura *Pichia* UHG42-3 almacenada en congelador en 20% de glicerol en un matraz Erlenmeyer de 300 ml con deflectores que contenía 50 ml del caldo de YPD, y se le sometió a cultivo con agitación a 30°C durante 24 horas.

② Cultivo principal

El caldo se sometió a un cultivo discontinuo alimentado durante un tiempo predeterminado en un medio (medio primario) con la composición mostrada en la Tabla 1, y entonces fue cultivado con adiciones sucesivas de metanol a la velocidad de alimentación mostrada en la Fig. 1.

TABLA 1

Composición del medio primario

Ingrediente	Concentración (/l)
glicerol	40,0 g
H ₃ PO ₄ (85%)	14,0 ml
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,6 g
K ₂ SO ₄	9,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,8 g
KOH	2,6 g
0,2 g/l de solución de biotina	1,6 ml
solución YTM*	4,4 ml

*Composición de la solución YTM**

Ingrediente	Concentración (g/l)
FeSO ₄ .2H ₂ O	65,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	6,0
MnSO ₄ .4-5H ₂ O	4,11
ZnSO ₄ .7H ₂ O	20,0
H ₂ SO ₄	5,0 (ml)

Para ser preciso, el líquido de precultivo (34 ml) se inoculó en una jarra de fermentación de 10 L (Biomaster tipo D, 10 L) que contenía 1,7 L de un medio cargado inicialmente (medio primario) y se sometió a cultivo con agitación y aereación. La temperatura del cultivo fue 30°C. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 900 rpm durante el cultivo discontinuo alimentado. El pH se ajustó constantemente a 5,85.

Para eliminar las espumas, se añadió la cantidad necesaria de un agente desespumante.

Cuando se consumió completamente el glicerol en el medio primario (24 horas de cultivo) durante el cultivo discontinuo alimentado, se inició la adición de metanol.

La velocidad de adición de metanol se controló de acuerdo con las siguientes fórmulas en las cuales t significa el periodo de tiempo (h) después del inicio de la adición de metanol:

cuando $0 \leq t < 72$, $F(t) = 3,712 \times \exp(0,025 \times t)$ (g/h)

cuando $72 \leq t < 92$, $F(t) = 22,456 \times \exp[-0,025 \times (t-72)]$

cuando $92 \leq t$, $F(t) = 13,62 \times \exp[0,002 \times (t-92)]$.

Los cambios de la velocidad de adición de metanol a lo largo del tiempo se muestran en la Fig. 1, en donde se muestra con línea de trazo continuo desde alrededor de la hora 24 hasta la hora 96 de cultivo; se muestra con una línea fina de trazo discontinuo desde alrededor de la hora 96 hasta la hora 116 de cultivo; y se muestra con una línea de trazo continuo desde alrededor de la hora 116 hasta la hora 360.

ES 2 191 064 T5

Durante el cultivo, desde alrededor de la hora 24 (tiempo de inicio de adición de metanol) hasta alrededor de la hora 96, se añadió metanol para conseguir una velocidad específica de multiplicación inicial μ' de la levadura *Pichia* de 0,025, y la velocidad de adición de metanol se disminuyó una vez moderadamente, tal como muestra la línea fina de trazo discontinuo en la figura, y se añadió metanol para que en todo momento la velocidad específica de multiplicación predeterminada μ'' de la levadura *Pichia* fuese de 0,002.

Como experimentos control se realizaron ① un cultivo en un sistema en el que μ se cambió desde 0,025 hasta 0,002 mediante cambios instantáneos en la velocidad de adición y ② un cultivo en un sistema sin cambios en μ .

Para cambiar μ en ①, la velocidad de adición de metanol en el sistema que comprende cambios instantáneos en la velocidad de adición de metanol se controló de acuerdo con las fórmulas siguientes, en las que t significa el periodo de tiempo (h) después del inicio de la adición de metanol, la cual se expresa mediante una línea de trazo continuo y una línea gruesa de trazo continuo en la Fig. 1:

cuando $0 \leq t < 72$, $F(t) = 3,712 \times \exp(0,025 \times t)$ (g/h)

cuando $72 \leq t$, $F(t) = 13,086 \times \exp[0,002 \times (t-72)]$.

Durante el cultivo, desde alrededor de la hora 24 (tiempo de inicio de la adición de metanol) hasta alrededor de la hora 96, se añadió metanol para que la velocidad específica de multiplicación μ' de la levadura *Pichia* fuese de 0,025, y para cambiar a la velocidad específica de multiplicación μ'' de la levadura *Pichia* a 0,002 se cambió instantáneamente la velocidad de adición de metanol para ajustar μ al valor de 0,002.

La velocidad de adición de metanol en el sistema ② sin cambios en μ se controló de acuerdo con las fórmulas siguientes donde t significa el periodo de tiempo (h) después del inicio de la adición de metanol. El control de acuerdo con las siguientes fórmulas es el método de cultivo adecuado en el sistema sin cambio de μ . Esto es, la alimentación se inició para que μ fuese 0,015, y cuando la concentración de oxígeno disuelto (concentración de oxígeno disuelto en el líquido de cultivo) disminuyó por debajo de un cierto nivel, se inició la alimentación a una velocidad constante. Los cambios de la velocidad de adición de metanol a lo largo del tiempo en este sistema están representados mediante una línea fina de trazo discontinuo en la Fig. 1:

cuando $0 \leq t < 127$, $F(t) = 2,176 \times \exp(0,015 \times t) + 1,632$ (g/h)

cuando $127 \leq t$, $F(t) = 16,253$.

La Fig. 2 muestra una comparación de los cambios de μ en el sistema que comprende un cambio continuo en la velocidad de adición de metanol [la presente invención, Fig. 2(a)] y los cambios de μ en el sistema que comprende cambios instantáneos en la velocidad de adición [control ①, Fig. 2(b)].

Los resultados de cada cultivo se muestran en la Fig. 3 como cambios en la densidad de células en función del tiempo (la presente invención y el control ①) y la Tabla 2 muestra la relación de la producción de HSA al completar el cultivo (la presente invención, el control ① y el control ②).

TABLA 2

Sistema de cultivo		Relación de producción de HSA
cambio de μ	cambio de velocidad de adición	
Ninguno (control ②)	-----	100%
realizado	cambio instantáneo (control ①)	107%
realizado	cambio continuo (presente invención)	156%

ES 2 191 064 T5

La comparación de la cantidad de HSA producido después de 360 horas de cultivo muestra que, si bien el cultivo dio mejores resultados cuando se cambió μ (la presente invención, control ①) que cuando no (control ②), la cantidad de HSA producida fue mayor (156%) en el sistema que comprende un cambio continuo en la velocidad de alimentación (la presente invención) que en el caso en que la velocidad de alimentación se cambió instantáneamente (control ①, 107%), por lo que quedó claro que el cambio continuo de la velocidad de alimentación del sustrato (metanol) en un intento para cambiar μ condujo a una mayor cantidad de la proteína deseada (HSA) producida.

Ejemplo 2

La cepa se cultivó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó el medio de alimentación mostrado en la Tabla 3 en vez de metanol en el cultivo principal.

Los resultados fueron similares a los obtenidos en el Ejemplo 1.

TABLA 3

Composición del medio de alimentación

Ingrediente	Cantidad (ml)
Solución de YTM	2
Metanol	1000

Ejemplo Referencia 1

Medida de la densidad de células

Se tomó una muestra de líquido de cultivo después de un tiempo de cultivo opcional, se diluyó con agua destilada para que el valor OD₅₄₀ después de su determinación estuviese por debajo de 0,3, y se sometió a la determinación de su absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (UV tipo 2200, Shimazu Corporation). El valor obtenido se multiplicó por la relación de dilución y se utilizó como la absorbancia del líquido de cultivo. Utilizando el valor de OD₅₄₀/5,6 como un índice, se calculó la densidad de células secas a partir de la absorbancia obtenida.

Ejemplo Referencia 2

Medida de la concentración de HSA

Se tomó una muestra de líquido de cultivo después de un tiempo de cultivo opcional y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de Ultrafree C3HV para conseguir una solución clara, que fue sometida a una filtración en un gel mediante HPLC bajo las condiciones siguientes.

Columna: TSKgel G3000SW_{x1}

Fase Móvil: NaCl 0,3 M, fosfato sódico 50 mM, 0,1% de NaN₃, pH 6,5

Caudal: 1,0 ml/min

Inyección: 50 μ l

Detección: A₂₈₀, A₃₅₀ (dos longitudes de onda).

Ejemplo Referencia 3

Medida de la concentración de metanol

Se tomó una muestra de líquido de cultivo después de un tiempo de cultivo opcional y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un Ultrafree C3HV para obtener una solución clara, que fue sometida a un análisis cuantitativo por HPLC bajo las siguientes condiciones.

Columna: Sugar-pak Ca (fabricada por Waters)

Fase Móvil: 0,02% NaN₃

Temperatura de la columna: 80°C

Inyección: 28 μ l

5 Detección: refractrómetro diferencial.

Aplicabilidad industrial

10 De acuerdo con el modo de cambio de la velocidad de adición del sustrato al medio de la presente invención, se pueden realizar patrones óptimos de velocidad específica de multiplicación μ y velocidad específica de producción ρ para optimizar el sistema de cultivo discontinuo alimentado. Como consecuencia de la realización, ha sido posible llevar a cabo un cultivo de alta densidad de la célula anfitriona mediante un cultivo discontinuo alimentado, y puede producirse la proteína deseada de manera eficaz en un tiempo corto.

15 Por lo tanto, el método de la presente invención es extremadamente útil como un método de producción industrial de proteínas tales como la HSA, IGF, prouroquinasa y UTI, que tienen altos valores comerciales.

20

25

30

35

40

45

50

55

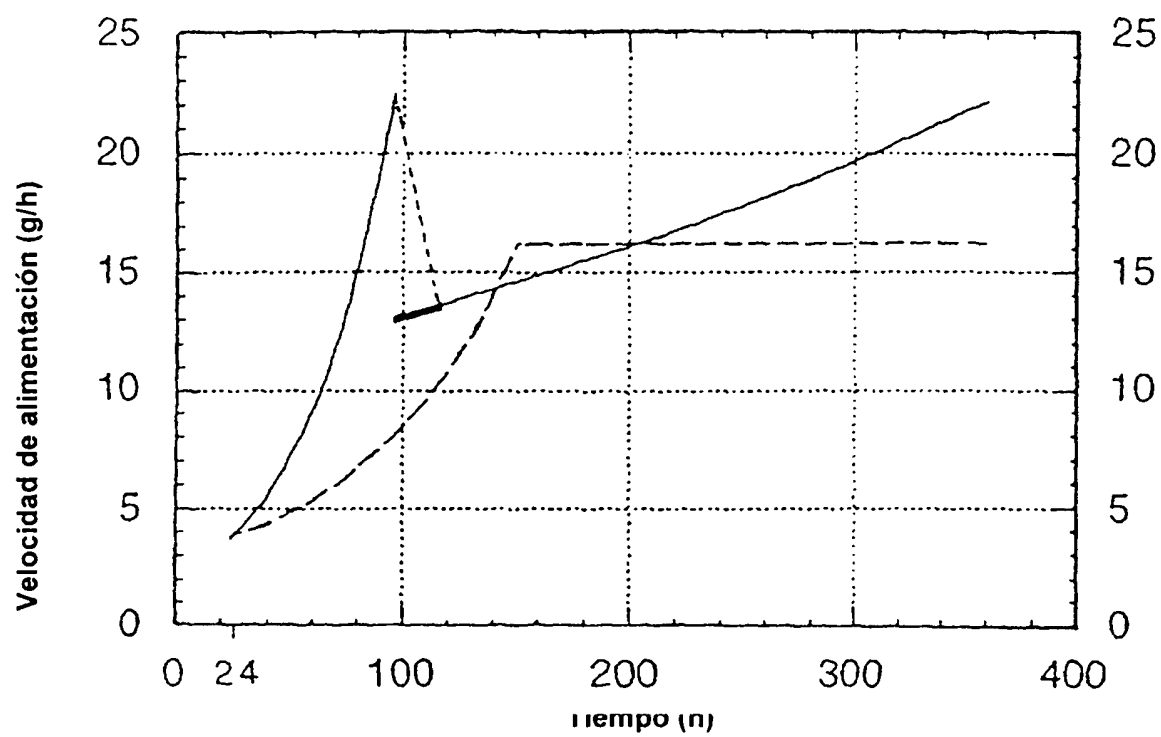
60

65

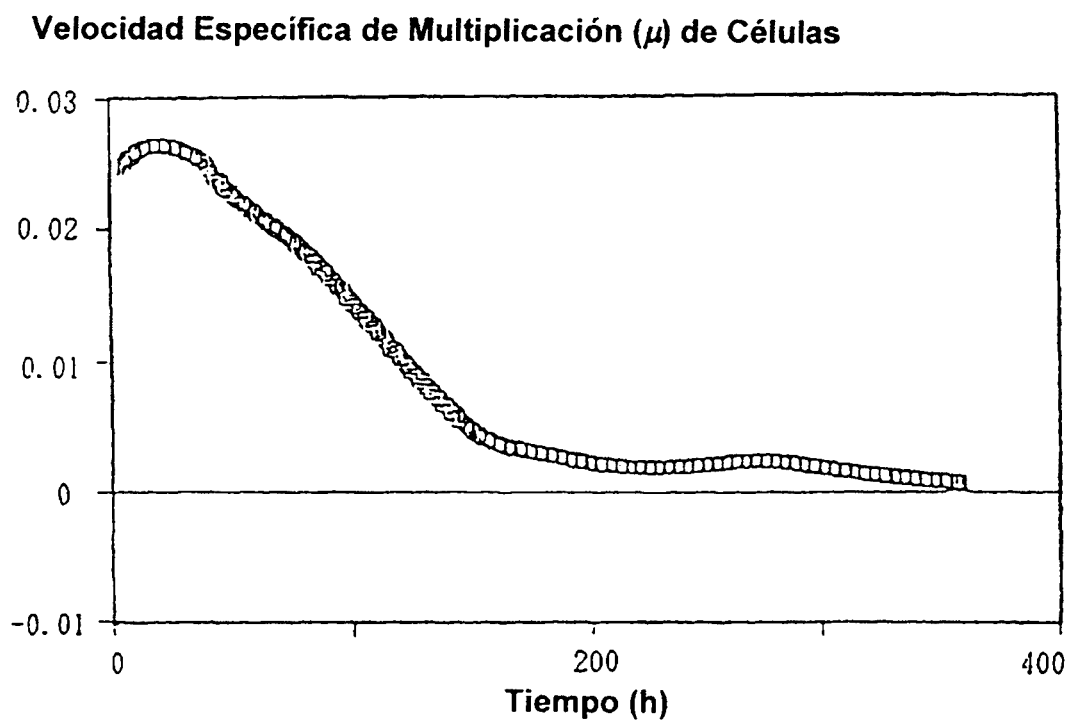
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una proteína deseada, que comprende hacer que prolifere, mediante un cultivo discontinuo alimentado, una célula anfitriona capaz de expresar la mencionada proteína, en el que la velocidad específica de multiplicación de la célula anfitriona se cambia desde la velocidad inicial hasta una predeterminada, mediante cambios continuos de la velocidad de adición de un sustrato, que controla el crecimiento de la célula anfitriona y en el que el periodo de tiempo durante el cual se mantiene la velocidad de multiplicación específica inicial se determina a partir de la relación entre la velocidad específica de multiplicación y la velocidad específica de producción.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula anfitriona expresa constitutivamente la proteína deseada.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula anfitriona expresa la proteína deseada cuando la célula anfitriona se multiplica en presencia de un inductor.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula anfitriona es derivada de una levadura.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula anfitriona es derivada de una levadura metilotrófica.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la célula anfitriona es derivada de la levadura *Pichia*.
- 25 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato que controla el crecimiento de la célula anfitriona es una fuente de energía de carbono.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la fuente de energía de carbono se selecciona de entre metanol, glicerina, sorbitol, glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa.
- 30 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la célula anfitriona es derivada de una levadura *Pichia*, y el sustrato que controla la multiplicación de la célula anfitriona se selecciona de metanol, glicerina y combinaciones de ambos.
- 35 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula anfitriona es derivada del género *Saccharomyces*, y el sustrato que controla el crecimiento de la célula anfitriona se selecciona de galactosa, sacarosa y combinaciones de ambos.
- 40 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína deseada es heteróloga a la célula anfitriona.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la proteína heteróloga es albúmina de suero humano.

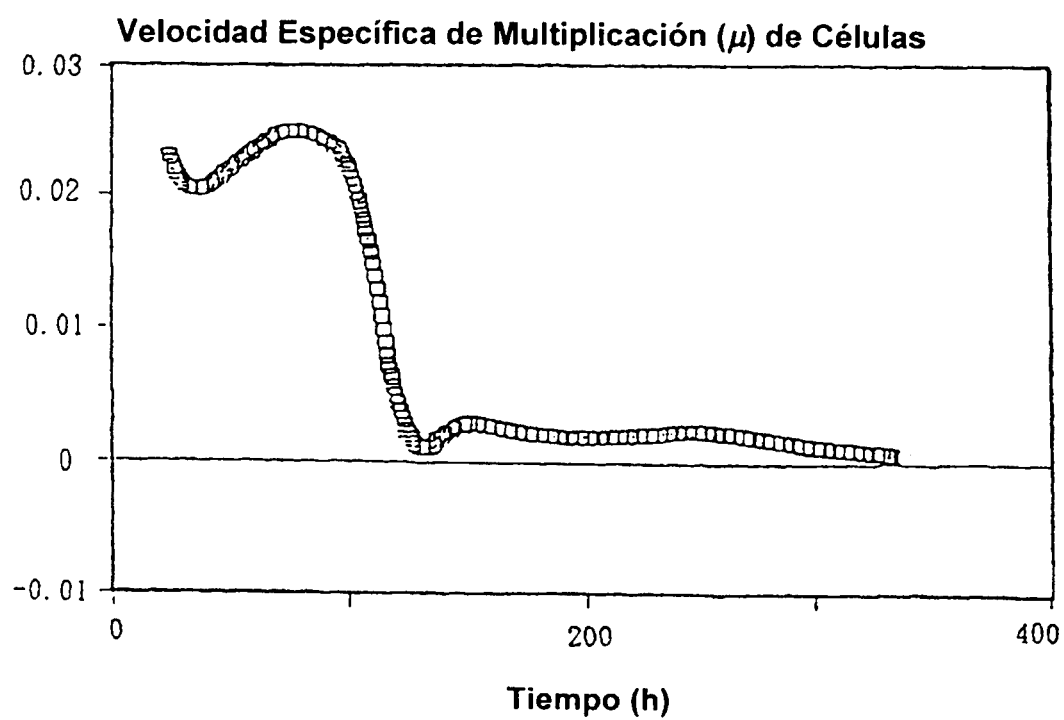
F I G . 1



F I G. 2 (a)



F I G. 2 (b)



F I G. 3

