



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 887**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/06** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**C07K 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01968701 .1**

96 Fecha de presentación : **06.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1315826**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2003**

54 Título: **Síntesis *in vitro* mejorada de proteínas activas que contienen enlaces disulfuro.**

30 Prioridad: **06.09.2000 US 230381 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.03.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.03.2010**

73 Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland  
Stanford Junior University  
900 Welch Road Suite 350  
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es: **Swartz, James, Robert y  
Kim, Dong-Myung**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Síntesis *in vitro* mejorada de proteínas activas que contienen enlaces disulfuro.

## 5 Antecedentes de la invención

*Escherichia coli* es un organismo ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas. Crece fácilmente hasta una densidad celular elevada en sustratos económicos para proporcionar productividades volumétricas excelentes y económicas. Diversas técnicas genéticas bien establecidas y varios vectores de expresión justifican además el uso de *Escherichia coli* como huésped de producción. Sin embargo, es necesaria una velocidad elevada de síntesis de proteínas, pero ni mucho menos es suficiente, para la producción eficaz de biomoléculas activas. Con el fin de ser biológicamente activa, la cadena polipeptídica debe plegarse en la estructura tridimensional nativa correcta, incluyendo la formación apropiada de enlaces disulfuro.

En muchos casos, se ha observado que los polipéptidos recombinantes se secuestran en agregados refráctiles grandes conocidos como cuerpos de inclusión. Se pueden recuperar proteínas activas a partir de los cuerpos de inclusión a través de un ciclo de solubilización inducido por desnaturalizante de los agregados, seguido de la eliminación del desnaturalizante en condiciones que favorecen el plegamiento. Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede facilitar algunas veces la purificación de proteínas expresadas; en la mayoría de ocasiones, el repliegamiento de las proteínas agregadas sigue siendo un desafío.

Se han realizado varios intentos para mejorar el plegamiento de proteínas heterólogas en el citoplasma bacteriano. Además de los métodos tradicionales, incluyendo la disminución de la temperatura del cultivo, el creciente conocimiento del mecanismo y efectores del plegamiento de proteínas ha permitido establecer nuevas estrategias para resolver el problema de agregación.

Estudios *in vitro* han demostrado que, para la gran mayoría de los polipéptidos, el plegamiento es un proceso espontáneo dirigido por la secuencia de aminoácidos y las condiciones del disolvente. Aunque el estado nativo está termodinámicamente favorecido, la escala de tiempo para el plegamiento puede variar desde milisegundos a días. Las barreras cinéticas se introducen, por ejemplo, por la necesidad para la alineación de subunidades y subdominios. Particularmente con proteínas eucariotas, las reacciones covalentes deben tener lugar para que se formen proteínas correctamente plegadas. Estos últimos tipos de reacciones incluyen la formación de enlaces disulfuro, la isomerización *cis/trans* de la cadena polipeptídica alrededor de los enlaces peptídicos de prolina, el procesamiento de preproteínas y la ligación de grupos prostéticos. Estas limitaciones cinéticas dan lugar a la acumulación de intermedios parcialmente plegados, que contienen superficies “pegajosas” hidrofóbicas expuestas que favorecen la auto-asociación y formación de agregados.

La expresión de proteínas de mamífero es más complicada que las proteínas bacterianas, ya que la mayoría de ellas requieren enlaces disulfuro intramoleculares para su actividad. De este modo, se requieren efectores adicionales, tales como foldasas y un potencial redox adecuado, para conseguir sus estructuras nativas. Aunque el espacio periplásmico de *Escherichia coli* proporciona un entorno oxidante, así como proteínas plegables, tales como DsbA, B, C, y D; en muchos casos, la simple secreción de proteínas complejas en el espacio periplásmico no es suficiente para formar enlaces disulfuro correctos.

Se ha observado que proteínas accesorias conocidas como foldasas y chaperones ayudan en el plegamiento correcto de proteínas *in vivo*. Las foldasas tienen una actividad catalítica que sirve para acelerar las etapas covalentes limitantes de la velocidad en el plegamiento. Los chaperones, por otro lado, realizan muchas funciones, la más importante de ellas es proporcionar un medio para que las proteínas nacientes se plieguen sin el proceso competitivo de auto-asociación. Además de los chaperones moleculares bien caracterizados, tales como las proteínas GroEL y DnaK, se han identificado un conjunto de proteínas citoplásmicas adicionales que afectan al plegamiento de proteínas heterólogas.

Tras el descubrimiento de numerosas foldasas bacterianas o eucariotas y sus funciones específicas en la oxidación e isomerización de enlaces disulfuro, se han realizado muchos intentos para utilizar estas proteínas en el espacio periplásmico o incluso en el citoplasma de *Escherichia coli* (véase, por ejemplo, Bessette *et al.* (1999)). Se ha observado que la coexpresión de chaperones moleculares resuelve parcialmente el problema de la formación de cuerpos de inclusión en la expresión de ciertas proteínas recombinantes (véase, por ejemplo, Richardson *et al.* (1998) Trends Biochem. Sci. 23: 138-143; y Bukau *et al.* (1998) Cell 92: 351-366).

Sin embargo, el efecto de los chaperones moleculares es bastante específico del producto y la coexpresión de cada chaperón molecular con las proteínas diana es a menudo dificultosa. Además, en algunos casos, la expresión de un chaperón molecular es perjudicial o incluso dañina para el crecimiento celular. A pesar de los recientes avances, la expresión de proteínas de mamífero correctamente plegadas en *Escherichia coli* aún sigue siendo un gran desafío. Esto es debido principalmente a las dificultades en el control de los parámetros clave para la formación de enlaces disulfuro incluyendo el potencial redox en el interior de las células.

Durante varias décadas, la síntesis de proteínas *in vitro* ha servido como una herramienta eficaz para la expresión a escala de laboratorio de materiales genéticos clonados o sintetizados. En los últimos años, se ha considerado la síntesis de proteínas *in vitro* como una alternativa a la tecnología convencional de ADN recombinante debido a las

desventajas asociadas con la expresión celular. *In vivo*, las proteínas se pueden degradar o modificar mediante diversas enzimas sintetizadas con el crecimiento de la célula, y, después de la síntesis, se pueden modificar mediante procesamiento post-traducciona, tal como glicosilación, desamidación u oxidación. Además, muchos productos inhiben procesos metabólicos y su síntesis debe competir con otros procesos celulares requeridos para reproducir la célula y para proteger su información genética.

Debido a que está esencialmente libre de la regulación celular de la expresión génica, la síntesis de proteínas *in vitro* presenta ventajas en la producción de proteínas citotóxicas, inestables o insolubles. La sobreproducción de proteínas más allá de una concentración predeterminada puede ser difícil de obtener *in vivo*, ya que los niveles de expresión son regulados por la concentración de producto. La concentración de proteína acumulada en la célula afecta en general a la viabilidad celular, de manera que la sobreproducción de la proteína deseada es difícil de obtener. En un proceso de aislamiento y purificación, muchos tipos de proteína son insolubles o inestables, y son degradadas por proteasas intracelulares o agregadas en cuerpos de inclusión, de manera que la tasa de pérdida es elevada.

La síntesis *in vitro* supera muchos de estos problemas (véase Kim y Swartz (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 66: 180-188; y Kim y Swartz (2000) *Biotechnol. Prog.* 16: 385-390). Además, a través de la expresión simultánea y rápida de varias proteínas en una configuración múltiple, esta tecnología puede proporcionar una herramienta valiosa para el desarrollo de *arrays* combinatorios para la investigación y el cribado de proteínas. Además, se pueden incorporar de manera eficaz varios tipos de aminoácidos no naturales en proteínas con objetivos específicos (Noren *et al.* (1989) *Science* 244: 182-188).

Merk *et al.*, 1999, *J. Biochem.*, Vol. 125, pág. 328-333, describe la síntesis de dos anticuerpos anti-lisozima de cadena única en un sistema de expresión de *E. coli* libre de células en presencia de glutatión reducido y oxidado, proteína disulfuro isomerasa (PDI) y chaperones.

Qu y Green, 1995, *DNA and Cell Biology*, Vol. 14, No. 9, pág. 741-751, describe el plegamiento y ensamblaje de una molécula MHC de clase II en un sistema libre de células.

Ryabova *et al.*, 1997, *Nature Biotech.*, Vol. 15, pág. 79-84, describe la producción de fragmentos scFv funcionales en un sistema de traducción libre de células de *E. coli* que incluye proteína disulfuro isomerasa (PDI).

A diferencia de la expresión génica *in vivo*, la síntesis de proteínas libres de células utiliza una maquinaria traduccional aislada en lugar de células completas. Como resultado, este método elimina la necesidad de mantener la fisiología celular y permite el control directo de varios parámetros para optimizar la síntesis/plegamiento de proteínas diana. De particular interés es el problema de la síntesis libre de células de proteínas de mamífero biológicamente activas que tienen múltiples enlaces disulfuro. La presente invención se dirige a la síntesis acoplada y plegamiento de proteínas de mamífero a través del control del potencial redox durante la síntesis de proteínas.

### Descripción resumida de la invención

Se proporcionan métodos para la síntesis *in vitro* mejorada de moléculas proteicas mediante la optimización de las condiciones redox en la mezcla de reacción tal como se define en las reivindicaciones. Se incluye un tampón redox para mantener el medio de oxidación apropiado para la formación de enlaces disulfuro adecuados, por ejemplo, mediante la inclusión de glutatión en una proporción apropiada de la forma oxidada con respecto a la reducida.

La mezcla de reacción se modifica además preferiblemente para disminuir la actividad de moléculas en el extracto, por ejemplo, enzimas endógenas que presentan una actividad reductora. Dichas moléculas se desactivan químicamente antes de la síntesis de proteínas libres de células, por ejemplo, mediante el tratamiento de los extractos con yodoacetamida (IAA), u otros compuestos que desactivan irreversiblemente grupos sulfhidrilo libres. La presencia de enzimas endógenas que presentan actividad reductora se puede disminuir además mediante el uso de extractos preparados a partir de células modificadas genéticamente que presentan mutaciones desactivadas en dichas enzimas, por ejemplo, tiorredoxin reductasa, glutatión reductasa, etc.

Además de estabilizar el potencial redox de la mezcla de reacción, la síntesis *in vitro* puede aumentarse además mediante la inclusión de proteínas accesorias que ayudan al plegamiento correcto de proteínas *in vivo*. De particular interés es la inclusión de foldasas, proteínas con una actividad catalítica que sirven para acelerar las etapas covalentes limitantes de la velocidad en el plegamiento, por ejemplo, PDI, dsbC, etc.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el reactor utilizado para las reacciones semicontinuas.

La figura 2 es un gráfico que representa a síntesis de uroquinasa y su actividad enzimática durante una reacción semicontinua.

La figura 3 es un gráfico de barras que representa el cambio en el potencial redox durante la síntesis semicontinua.

La figura 4 es la evolución con el tiempo que muestra la reducción de glutatión en una reacción de síntesis discontinua.

La figura 5 muestra la reducción de glutatión en presencia de extractos de diferentes cepas bacterianas.

La figura 6 es un gráfico de barras que representa la expresión de uroquinasa en extractos de control y tratados con IAA.

La figura 7 muestra las evoluciones con el tiempo de la reducción de glutatión y la actividad enzimática de producto en extractos de control y tratados con IAA.

La figura 8 es la evolución con el tiempo de la síntesis de uroquinasa en presencia de PDI o dsbC.

### Descripción detallada de las realizaciones

Se proporcionan métodos para la síntesis *in vitro* mejorada de proteínas biológicamente activas, particularmente proteínas que comprenden uno o más enlaces disulfuro tal como se definen en las reivindicaciones. Se modifica la mezcla de reacción para la síntesis de proteínas *in vitro* para mejorar el plegamiento de proteínas y la formación de enlaces disulfuro. Se incluye un tampón redox en la mezcla de reacción para mantener el medio oxidante adecuado, por ejemplo, mediante la inclusión de glutatión en una proporción adecuada de la forma oxidada con respecto a la reducida. El tampón redox se estabiliza además mediante la desactivación de reacciones con oxidorreductasas endógenas. La inclusión de un tampón redox permite la producción de proteínas bioactivas que requieren la formación de uno o más enlaces disulfuro intramoleculares para la actividad.

Las moléculas endógenas que reducen el tampón redox se desactivan químicamente antes de la síntesis, por ejemplo, mediante el tratamiento de los extractos con compuestos, tales como yodoacetamida (IAA), que desactivan irreversiblemente grupos sulfhidrilo libres.

En algunos métodos de la síntesis de proteínas *in vitro*, se utilizan enzimas endógenas para la generación o reabastecimiento de fuentes de energía utilizadas en la reacción (véase, por ejemplo, la solicitud de patente en trámite 091270,814). En algunos casos, dichas enzimas endógenas se desactivan mediante la etapa de desactivación química descrita anteriormente, y en ese caso, puede ser deseable reabastecer estas enzimas de una fuente exógena, antes o conjuntamente con la síntesis. A modo de ejemplo, si se desea el uso de fuentes de energía secundarias no tradicionales, tales como intermedios glicolíticos tempranos (por ejemplo, glucosa 6-fosfato), la actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se puede restablecer mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

La presencia de enzimas endógenas que presentan actividad reductora se puede disminuir además mediante el uso de extractos preparados a partir de células modificadas genéticamente que tienen mutaciones desactivantes en dichas enzimas, por ejemplo, tiorredoxin reductasa, glutatión reductasa, etc.

Además de tamponar el potencial de redox de la mezcla de reacción, la síntesis *in vitro* se puede mejorar además mediante la inclusión de proteínas accesorias que ayudan al plegamiento correcto de proteínas *in vivo*. De particular interés es la inclusión de foldasas, proteínas con una actividad catalítica que sirven para acelerar las etapas covalentes limitantes de la velocidad en el plegamiento, por ejemplo, PDI, dsbC, etc.

Estos métodos son aplicables a reacciones continuas, semicontinuas o discontinuas. En el sistema semicontinuo, incluso cuando las enzimas endógenas reductoras no están desactivadas, el nivel de oxidación del tampón redox se recuperará sustancialmente después de una incubación prolongada. La recuperación de un medio oxidante en la cámara de reacción permite que la proteína sintetizada adquiera enlaces disulfuro y actividad. Sin embargo, los extractos con oxidorreductasas desactivadas proporcionan una formación más rápida de proteínas bioactivas.

Para algunas reacciones sintéticas, por ejemplo, reacciones múltiples, es preferible utilizar un sistema discontinuo en lugar de semicontinuo. Para los métodos de síntesis discontinua, la mezcla de reacción se modifica preferiblemente para disminuir la actividad de moléculas en el extracto, por ejemplo, enzimas endógenas, que tienen actividad reductora.

### Definiciones

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos concretos descritos, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente invención tiene el objetivo de describir sólo realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se utiliza en la presente invención las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a “la proteína” incluye la referencia a una o más proteínas y equivalentes de la misma conocidos por los expertos en la materia, etcétera. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado tal como es entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

El plegamiento, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la estructura tridimensional de polipéptidos y proteínas, donde las interacciones entre los residuos de aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Aunque las interacciones no covalentes son importantes para determinar la estructura, normalmente los péptidos y proteínas de interés tendrán enlaces covalentes intramoleculares y/o intermoleculares formados por dos residuos de cisteína. Para proteínas y polipéptidos naturales o derivados o variantes de los mismos, el plegamiento correcto es normalmente la disposición que da lugar a una actividad biológica óptima, y se puede monitorizar convenientemente 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 actividad biológica serán menos importantes. El plegamiento correcto de dichas moléculas se puede determinar en base a propiedades físicas, consideraciones energéticas, estudios de modelaje, y similares.

La síntesis *in vitro*, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la síntesis de polipéptidos libre de células en una mezcla de reacción que comprende extractos biológicos y/o reactivos determinados. La mezcla de reacción comprenderá por lo menos ATP, una fuente de energía; un molde para la producción de la macromolécula, por ejemplo, ADN, ARNm, etc.; aminoácidos, y dichos cofactores, enzimas y otros reactivos que son necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores de transcripción, etc. Dichos sistemas de reacción sintéticos son bien conocidos en la técnica y se han descrito en la literatura. La reacción de síntesis libre de células se puede realizar de forma discontinua, en flujo continuo o flujo semicontinuo, tal como se conoce en la técnica.

Tampón redox. La mezcla de reacción sintética en la presente invención se modifica mediante la adición de un tampón redox, que comprende uno o más de glutatión, ditiotreitól, ditióeritritól,  $\beta$ -mercaptoetanol, tioglicolato y cisteína. La concentración de agente reductor y la proporción de la forma oxidada con respecto a la reducida necesaria para conseguir el poder reductor deseado para el tiempo de reacción seleccionado variarán según la fuerza del agente reductor, el nivel de  $O_2$  en el sistema y el tiempo de reacción.

En una realización preferida, se utiliza glutatión como agente tamponador redox y se añade en una concentración de por lo menos aproximadamente 1 mM y no más de aproximadamente 25 mM, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 5 a 10 mM.

El tampón redox puede comprender las formas oxidadas y reducidas del compuesto sulfhidrilo e una proporción ente aproximadamente 10:1 a 1:1 de las formas oxidada: reducida, normalmente en una proporción entre aproximadamente 5:1 a 2:1, y puede estar en una proporción de 4:1.

Extractos biológicos. Para los objetivos de la presente invención, los extractos biológicos son cualquier preparación que comprende los componentes de una maquinaria de síntesis de proteínas, normalmente un extracto de células bacterianas, donde dichos componentes son capaces de expresar un ácido nucleico que codifica una proteína deseada. De este modo, un extracto bacteriano comprende componentes que son capaces de traducir ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica una proteína deseada y, opcionalmente, comprende componentes que son capaces de transcribir ADN que codifica una proteína deseada. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, ARN polimerasa dirigida a ADN (ARN polimerasa), cualquier activador de la transcripción que sea requerido para el inicio de la transcripción de ADN que codifica la proteína deseada, ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNts), aminoacil ARNt sintetasas, ribosomas 70S, N10-formiltetrahidrofolato, formilmetionina-ARNtMet sintetasa, peptidiltransferasa, factores de iniciación, tales como IF-1, IF-2 e IF-3, factores de elongación, tales como EF-Tu, EF-Ts, y EF-G, factores de liberación, tales como RF-1, RF-2, y RF-3, y similares.

En una realización preferida de la invención, la mezcla de reacción comprende extractos de células bacterianas, por ejemplo extractos de *E. coli* S30, tal y como se conoce en la técnica. Por conveniencia, el organismo utilizado como fuente de extractos puede referirse como el organismo fuente. Los métodos para producir extractos activos se conocen en la técnica, por ejemplo pueden encontrarse en Pratt (1984), Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems, pág. 179-209, en Hames, B. D. y Higgins, S. J. (ed.), Transcription and Translation: A Practical Approach, IRL Press, New York. Kudlicki *et al.* (1992) Anal Biochem 206(2):389-93 modifican el extracto libre de células de *E. coli* S30 mediante la recogida de la fracción ribosómica del S30 mediante ultracentrifugación. Aunque dichos extractos son una fuente útil de ribosomas y otros factores necesarios para la síntesis proteica, también pueden contener cantidades pequeñas de enzimas responsables de reacciones secundarias indeseables que no están relacionadas con la síntesis proteica, pero que modulan el medio oxidante de la reacción, y que pueden actuar para reducir los grupos en el polipéptido naciente y el tampón redox.

*Extractos optimizados por redox.* Los extractos biológicos para los métodos presentes se optimizan preferiblemente para eliminar sustancialmente enzimas y otras biomoléculas presentes en el extracto que actúan para reducir el tampón redox. Los enzimas indeseables pueden eliminarse o, en cualquier caso, desactivarse en la mezcla de reacción.

Las moléculas endógenas que tienen grupos sulfhidrilo libres se desactivan antes del inicio de la síntesis mediante el tratamiento con un compuesto que bloquea químicamente los sulfhidrilos mediante alquilación o acetilación de los sulfhidrilos libres. A continuación, se elimina el compuesto desactivante de la mezcla de reacción, por ejemplo mediante diálisis, etc.

Los agentes desactivantes útiles incluyen yodoacetamida, N-etil maleimida, yodoacetato, N-yodoacetil-N'-(5-sulfónico-1-naftil)etilen diamina, etc., tal y como se conoce en el arte; especialmente los compuestos que incluyen yodoacetamidas, maleimidadas, haluros bencílicos y bromometilcetonas. La concentración de agente desactivante y la longitud de tiempo para la reacción se determinarán mediante el compuesto específico que se ha elegido. El agente desactivante se añade en una concentración que elimina sustancialmente la actividad reductora de sulfhidrilo endógeno, mientras mantiene la actividad sintética del extracto. Ambas actividades se determinan fácilmente mediante los métodos ilustrados en los ejemplos indicados. Normalmente, se mantendrá por lo menos aproximadamente el 50% de la actividad sintética, más normalmente por lo menos aproximadamente el 75%, y preferiblemente por lo menos aproximadamente el 90%. Como ejemplo, cuando el agente desactivante es yodoacetamida, puede añadirse en una concentración desde aproximadamente 1 hasta 10 mM, e incubarse entre 15 a 60 minutos.

Además del uso de un agente desactivante para tratar previamente los extractos biológicos, puede modificarse adicionalmente la actividad reductora del extracto mediante la modificación genética de la cepa fuente para “noquear” (*knock-out*), o desactivar genéticamente enzimas que tienen esta actividad indeseable. Dichas enzimas pueden incluir tioredoxin reductasa, glutatión reductasa, y similares.

La secuencia codificante para la enzima se “noquea”, en cualquier caso, se desactiva en el cromosoma del organismo fuente, mediante la supresión de toda la secuencia codificante o parte de la misma; inserción por desplazamiento del marco; mutaciones dominantes negativas, etc. Los genomas de un conjunto de organismos, incluyendo *E. coli*, se han secuenciado completamente, facilitando de este modo las modificaciones genéticas. Por ejemplo, un método de estrategia de “noqueo” sin marcador es descrito por Arigoni *et al.* (1998) Nat Biotechnol 16(9):851-6.

Un método preferido para desactivar genes dirigidos está descrito por Hoang *et al.* (1998) Gene 212: 77-86. En este método, se emplean vectores de reemplazo de genes que contienen un gen de resistencia a tetraciclina y un gen que codifica levan sacarasa (*sacB*) como marcadores de selección para recombinación. El gen diana en primer lugar se clona y se mutageniza, preferiblemente mediante la supresión de una parte significativa del gen. A continuación, se inserta este gen mediante unión en un vector diseñado para facilitar la sustitución del gen cromosómico. A continuación, las células de *E. coli* se transforman con estos vectores. Se seleccionan las células que han incorporado el plásmido en el cromosoma en el sitio del gen diana, a continuación se fuerza el plásmido a salir del cromosoma mediante el crecimiento de las células en sacarosa. La sacarosa es tóxica cuando el gen de *sacB* reside en el cromosoma. Se selecciona la cepa correctamente mutada en base a su fenotipo de sensibilidad a la tetraciclina y resistencia a la sacarosa. A continuación, el análisis de PCR o la secuenciación del ADN confirman el cambio genético deseado.

La enzima puede eliminarse del extracto celular después de la destrucción celular y antes del uso. Puede utilizarse cualquiera de los diversos medios conocidos en la técnica de la purificación proteica, incluyendo técnicas de purificación por afinidad, tales como el uso de anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos con afinidad específica por las enzimas diana; el uso de etiquetas de afinidad expresadas como parte de las enzimas diana para facilitar su eliminación del extracto celular; y los métodos de purificación convencionales.

Por ejemplo, se selecciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab o scFv) por la afinidad específica por la enzima diana utilizando la expresión en fagos u otras técnicas bien desarrolladas. A continuación, se inmoviliza este anticuerpo o fragmento de anticuerpo en cualquiera de las diversas esferas o resinas o membranas de purificación utilizando cualquiera de las diversas técnicas de inmovilización. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con el extracto celular para unirse a la enzima diana, y a continuación se elimina el complejo anticuerpo/enzima mediante filtración o centrifugación suave.

En otro ejemplo, puede modificarse la secuencia codificante de la proteína dirigida para incluir una etiqueta, tal como la extensión Flag® (desarrollada por Immunex Corp. y comercializada por Stratagene), o una cola de polihistidina. Se han publicado muchos otros ejemplos y son conocidos por los expertos en la materia. A continuación, se eliminan las proteínas marcadas mediante el paso por la matriz o la columna de afinidad apropiada. Se eligen la extensión de aminoácido y la pareja de unión de manera que la unión específica sólo suceda bajo condiciones compatibles con la estabilidad del extracto celular, y sin alterar significativamente la composición química del extracto celular.

En otro ejemplo, se separan la enzima o las enzimas diana mediante cualquiera de los diversos métodos utilizados habitualmente para la purificación proteica, tal como cromatografía de afinidad de sustrato, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, separación electroforética, u otros métodos realizados en la técnica de la purificación proteica.

*Adición de enzimas de plegamiento.* La mezcla de reacción de la presente invención se puede modificar además mediante la inclusión de una o más enzimas que aumentan el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, es decir, foldasas, chaperoninas, etc. En una realización de la presente invención, se añade una enzima foldasa bacteriana a la mezcla de reacción. Se han caracterizado en *E. coli* un conjunto de cisteína oxidorreductasas que catalizan la formación de enlaces disulfuro, por ejemplo. Entre las enzimas o chaperoninas de interés se incluyen DsbA, DsbC, PDI, GroEL, DnaK, DnaJ, GroEL/ES, GrpE, BIP, PPI u otras ciclofilinas, etc. Se añaden enzima o enzimas de plegamiento a una concentración eficaz para mejorar la actividad global de la proteína diana de interés, que se puede determinar empíricamente mediante la valoración de la actividad biológica del producto proteico expresado.

De particular interés es la inclusión de DsbC, una enzima soluble con actividad oxidasa e isomerasa que cataliza la redistribución, o isomerización, de enlaces disulfuro incorrectos. El emparejamiento incorrecto de residuos de cisteína aparece fácilmente cuando una cadena polipeptídica no plegada se oxida en primer lugar. DsbC facilita la destrucción de enlaces disulfuro incorrectos y la posterior formación de los que aparecen en el estado nativo. También de interés es el uso de la enzima soluble DsbA, que es un catalizador principal de la formación de enlaces disulfuro.

La identificación del gen de DsbC es descrita por Missiakas *et al.* (1994) EMBO J 13: 2013-2020, donde se muestra que tiene una actividad similar a la de DsbA en la reducción dependiente de ditiotreitól de insulina *in vitro*. Véase también Chen *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274: 19601-19605. El uso de DsbA o DsbC para aumentar el plegamiento periplásmico se describe en Joly *et al.* (1998) P.N.A.S. 95: 2773-2777.

Como alternativa a enzimas bacterianas, se pueden utilizar enzimas eucariotas. Por ejemplo, la PDI eucariota no es sólo un catalizador eficaz de la oxidación de cisteínas de proteínas e isomerización de enlaces disulfuro, sino que también exhibe la actividad chaperonas. La coexpresión de PCI puede incluso facilitar la producción de proteínas activas que tienen múltiples enlaces disulfuro. La razón por la que la PDI es tan eficaz en el aumento del plegamiento de proteínas recombinantes en bacterias es presumiblemente debido a que contiene un subdominio de unión a péptido que permite la interacción con proteínas heterólogas más fácilmente que las enzimas bacterianas. La inclusión de PDI de mamífero proporciona un excelente catalizador de isomerización de enlaces disulfuro *in vitro*.

Los términos “proteína deseada” o “proteína seleccionada” se utilizan indistintamente y se refiere en general a cualquier péptido o proteína que tiene más de aproximadamente 5 aminoácidos. Los polipéptidos pueden ser homólogos, o preferiblemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, extraños, a las bacterias de las que se deriva el extracto bacteriano libre de células, tal como una proteína humana o una proteína de levadura producida en el extracto bacteriano libre de células. Preferiblemente, se utilizan polipéptidos de mamífero, es decir, polipéptidos codificados en un genoma de mamífero.

Ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen, pero sin limitación, moléculas, tales como renina; hormonas de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humano; hormona de crecimiento bovino; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroides; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; insulina, proinsulina; hormona estimulante de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores coagulantes, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes, tales como la Proteína C, factor natriurético atrial; tensoactivo pulmonar; un activador plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES y otras quimioquinas; proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1a); una albúmina de suero, tal como, tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrópico, tal como factor neurotrópico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, 6 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como  $\alpha$ FGF y  $\beta$ FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5; factor de crecimiento I y II de tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP), un interferón, tal como interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , y - $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-18; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor acelerante de la descomposición; antígeno viral, tal como, por ejemplo, una parte de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte; receptores “homing”; adhesinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

#### *Métodos para síntesis in vitro mejorada*

El sistema objeto es útil para la síntesis de proteínas *in vitro* de proteínas biológicamente activas, particularmente proteínas que requieren la formación correcta de uno o más enlaces disulfuro para la actividad biológica. Las reacciones de síntesis pueden incluir la transcripción de ARN a partir de moldes de ADN o ARN. Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala, pequeña escala, o se pueden multiplicar para realizar un conjunto de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas utilizarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos, y pueden aislar el producto final como parte del proceso. Los sistemas discontinuos también son de interés, donde se pueden introducir reactivos adicionales para prolongar el periodo de tiempo para la síntesis activa. Se puede desarrollar el reactor en cualquier modo, tal como discontinuo, discontinuo prolongado, semidiscontinuo, semicontinuo, alimentación discontinua y continuo y se seleccionará según la aplicación objetivo.

De particular interés es la traducción de ARNm para producir proteínas, cuya traducción se puede acoplar a la síntesis *in vitro* de ARN a partir del molde de ADN. Dicho sistema libre de células contendrá todos los factores requeridos para la traducción de ARNm, por ejemplo ribosomas, aminoácidos, ARNts, aminoacil sintetetasas, factores de elongación y factores de iniciación. Los sistemas libres de células conocidos en la técnica incluyen extractos de

germen de trigo (Roberts *et al.* (1973) P.N.A.S. 70: 2330), extractos de reticulocitos (Pelham *et al.* (1976) Eur. J. Biochem. 67: 247), extractos de *E. coli*, etc., que se pueden tratar con una nucleasa adecuada para eliminar el ARNm endógeno activo.

Además de los componentes anteriores, tales como el extracto libre de células, el molde genético, aminoácidos y fuentes de energía, se pueden añadir a la reacción materiales específicamente requeridos para la síntesis de proteínas. Estos materiales incluyen sal, compuestos poliméricos, AMP cíclico, inhibidores para enzimas degradadoras de proteínas o ácidos nucleicos, inhibidor o regulador de síntesis de proteínas, ajustador de oxidación/reducción, tensoactivo no desnaturizante, componente tampón, espermina, espermidina, etc.

Las sales incluyen preferiblemente sales de potasio, magnesio, amonio y manganeso de ácido acético o ácido sulfúrico, y algunos de éstos pueden tener aminoácidos como contraponos. El compuesto polimérico puede ser polietilenglicol, dextrano, dietil aminoetil, aminoetil cuaternario y aminoetil. El ajustador de oxidación/reducción puede ser ditioneitol, ácido ascórbico, glutatión y/o sus óxidos. Además, se puede utilizar un tensoactivo no desnaturizante, tal como Triton X-100, en una concentración de 0-0,5 M. La espermina y espermidina se pueden utilizar para mejorar la capacidad sintética de proteínas y se puede utilizar AMPc como regulador de la expresión génica.

Cuando se cambia la concentración de un componente concreto del medio de reacción, se puede cambiar la de otro componente de forma correspondiente. Por ejemplo, las concentraciones de diversos componentes, tales como nucleótidos y compuestos como fuentes de energía, se pueden controlar simultáneamente según el cambio en las concentraciones de otros componentes. Además, los niveles de concentración de componentes en el reactor se pueden variar a lo largo del tiempo.

Preferiblemente, la reacción se mantiene en el intervalo de pH 5-10 y una temperatura de 20°-50°C., y más preferiblemente, en el intervalo de pH 6-9 y una temperatura de 25°-40°C.

Cuando se utiliza un medio aislante de proteínas en un modo de operación continua, la salida del producto del reactor fluye a través de una membrana en el medio aislante de proteína. En un modo de operación semicontinua, la superficie exterior o externa de la membrana se pone en contacto con soluciones predeterminadas que se cambian cíclicamente en un orden predeterminado. Estas soluciones contienen sustratos, tales como aminoácidos y nucleótidos. En este momento, el reactor opera en diálisis, diafiltración discontinua o modo de alimentación discontinua. Se puede suministrar una solución de alimentación al reactor a través de la misma membrana o una unidad de inyección separada. La proteína sintetizada se acumula en el reactor y, a continuación, se aísla y purifica según el método habitual para la purificación de proteínas después de completar la operación del sistema.

Cuando existe un flujo de reactivos, la dirección del flujo de líquido puede ser perpendicular y/o tangencial a la membrana. El flujo tangencial es eficaz para reciclar ATP y para evitar que la membrana se tapone y se pueda superponer sobre el flujo perpendicular. El flujo perpendicular a la membrana puede estar causado o realizado por una bomba de presión positiva o una bomba de succión al vacío. La solución en contacto con la superficie externa de la membrana puede cambiar cíclicamente y puede estar en un flujo tangencial estacionario con respecto a la membrana. El reactor se puede agitar interna o externamente mediante medios de agitación adecuados.

Durante la síntesis de proteínas en el reactor, entre los medios de aislamiento de proteínas para aislar selectivamente la proteína deseada se pueden incluir una unidad rellena con partículas recubiertas con moléculas de anticuerpos u otras moléculas inmovilizadas con un componente para adsorber la proteína sintetizada deseada y una membrana con poros de tamaños adecuados. Preferiblemente, el medio de aislamiento de proteínas comprende dos columnas para su uso alternado. Alternativamente, el producto proteico se puede absorber utilizando una cromatografía en lecho expandido, en cuyo caso se puede utilizar o no una membrana.

La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción se puede medir de varias maneras. Un método depende de la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína concreta a traducir. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad de proteína es un sistema de ensayo de luciferasa o un sistema de ensayo de acetil transferasa cloramfenical. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida a partir de la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que es desactiva debido al plegamiento incorrecto de proteína o a la falta de otras modificaciones post-traduccionales necesarias para la actividad de proteína.

Otro método de medir la cantidad de proteína producida en las reacciones de transcripción y traducción *in vitro* acoplada es realizar las reacciones utilizando una cantidad conocida de aminoácido radiomarcado, tal como <sup>35</sup>S-metionina o <sup>3</sup>H-leucina, y posteriormente medir la cantidad de aminoácido radiomarcado incorporado 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 proteínas truncadas. La proteína radiomarcada se puede separar además en un gel de proteína y mediante autorradiografía se puede confirmar que el producto tiene el tamaño adecuado y que no se han producido productos de proteínas secundarios.

En realizaciones que utilizan molde de ADN para impulsar la transcripción/traducción *in vitro*, algunos componentes del sistema de transcripción y/o traducción en el extracto bacteriano se pueden complementar de manera ventajosa para aumentar la disponibilidad de dichos componentes en la mezcla de reacción. En una realización preferida, la

mezcla de reacción contiene uno o más de los siguientes: (1) una concentración inicial de GTP, UTP y CTP de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM, y preferiblemente aproximadamente 0,85 mM; (2) una concentración inicial de ATP de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,5 mM, y preferiblemente aproximadamente 1,22 mM; (3) una concentración inicial de PEP de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, y preferiblemente aproximadamente 27,0 mM; (4) una concentración de piruvato quinasa de aproximadamente 0,05 unidades/ml a aproximadamente 0,5 unidades/mL, y preferiblemente aproximadamente 0,2 unidades/mL; (5) una concentración inicial de ARNTs de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL, y preferiblemente aproximadamente 0,17 mg/mL; (6) una concentración inicial de los 19 aminoácidos (todos los aminoácidos menos metionina) de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,6 mM, y preferiblemente aproximadamente 0,35 mM; y (7) una concentración inicial de metionina de aproximadamente 0,6 micromoles/litro ( $\mu$ M) a aproximadamente 2,0 mM, y preferiblemente de aproximadamente 4,3  $\mu$ M a aproximadamente 2,0 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,0 mM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM.

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, construcciones y reactivos concretos descritos, ya que éstos, naturalmente, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente invención tiene el objetivo de describir sólo realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado que entendería normalmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en la presente invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente invención tienen el objetivo de describir y dar a conocer, por ejemplo, las líneas celulares, construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones que se podrían utilizar en relación con la invención aquí descrita. Las publicaciones indicadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente por su conocimiento antes de la fecha de solicitud de la presente solicitud.

Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a los expertos en la materia una descripción completa de cómo fabricar y utilizar la presente invención y no pretende limitar el alcance de lo que se considera como la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, concentraciones, etc.), pero deben tenerse en cuenta ciertos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es a presión atmosférica o próxima a ella.

## Parte experimental

### *Expresión del dominio serina proteasa de uroquinasa murina en un sistema libre de células*

La mezcla de reacción estándar para la síntesis de proteínas libre de células consiste en los siguientes componentes: 57 mM Hepes-KOH (pH 8,2), 1,2 mM ATP, 0,85 mM de cada uno de GTP, UTP y CTP, 0,64 mM AMPc, 200 mM de glutamato de potasio, 80 mM  $\text{NH}_4(\text{OAc})$ , 15 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 34  $\mu\text{g/ml}$  ácido fólico, 6,7  $\mu\text{g/ml}$  plásmido, 33  $\mu\text{g/ml}$  T7ARN polimerasa, 500  $\mu\text{M}$  de cada uno de 20 aminoácidos no marcados y [ $^3\text{H}$ ] leucina (0,27 GBq/mmol), 2% PEG 8000, 33 mM PEP(fosfoenolpiruvato), 1 mM de glutatión reducido (GSH), 4 mM de glutatión oxidado (GSSG) y 0,24 volúmenes de extracto S30. Para la expresión del dominio serina proteasa de uroquinasa murina, se utilizó el plásmido pK7UK que contiene la secuencia codificante bajo el promotor T7.

En ciertos experimentos, las proteínas dsbC de *E. coli* o PDI humana se añaden en diferentes concentraciones. La PDI se adquirió de Pierce, Inc. y dsbC se purificó a partir del cultivo de la cepa BL21DE3 de *E. coli* (pETdsbChisC). La T7 ARN polimerasa se preparó a partir del cultivo de la cepa BL21 de *E. coli* (pAR1219) según los procedimientos ligeramente modificados de Davanloo *et al.* (1984) P.N.A.S. 81: 2035-2039. También se utiliza la cepa FA113 de *E. coli* que porta mutaciones en trxB y gor.

El extracto S30 se prepare a partir de *E. coli* K12 (cepa A19) según los procedimientos indicados en Pratt (1984) Coupled Transcription-Translation in Prokaryotic Cell-free Systems, p. 179-209. En Hames, B. D. y Higgins, S. J. (ed.), Transcription and Translation: a Practical Approach. IRL Press, New York. Para un tratamiento posterior del extracto S30, el extracto se mezcló con 0,1 volúmenes de yodoacetamida (IAA) 20 mM y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar la IAA o sulfato de sodio residual, el extracto se dializó frente a 200 volúmenes de tampón de S30 (10 mM Tris-Cl, pH 7,8, 14 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 60 mM  $\text{K}(\text{OAc})$ ) a 4°C durante 4 horas.

Para la expresión de proteína en el sistema semicontinuo, se incubaron 210  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción estándar en una cámara de diálisis (Slide-A-Lyzer, corte de peso molecular de 10.000, Pierce, IL) que se colocaron en un tampón de reserva de 6,0 mL (igual que en la mezcla de reacción a excepción de la ausencia de extracto S30, ADN y T7 ARN polimerasa).

Todas las reacciones de síntesis se realizaron a 37°C para los periodos de tiempo determinados.

Determinación del rendimiento de la síntesis de proteínas. La cantidad de proteína sintetizada se estimó a partir de la radioactividad insoluble en TCA medida en un contador de centelleo líquido (LS3801, Beckman) tal como se describe por Kim, *et al.* (1996) Eur. J. Biochem. 239: 881-886.

Actividad enzimática de dominio proteasa de uroquinasa sintetizado libre de células. Se tomaron muestras de 20 µL durante periodos de incubación para medir la actividad enzimática de proteína sintetizada. Después de centrifugar las muestras, se tomaron 10 ml de sobrenadante y se añadieron a una microplaca que contenía 80 µL de tampón de ensayo (38 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,8) y 10 µL de solución de sustrato (2 mM Chromozyme U, Roche Molecular Biochemicals, CA). El cambio en la absorbancia a 405 nm se midió en un lector de microplaca (SpectraMax 190, Molecular Devices, CA).

Análisis de la concentración de glutatión reducido. La concentración de glutatión reducido se midió utilizando ácido ditionitrobenzoico (DTNB). Se preparó una solución de DTNB 4,0 mg/mL en una solución Tris-Cl 1 M (pH 7,8). Se mezclaron muestras de 10 µL con el mismo volumen de TCA al 10% para detener la reducción enzimática y se centrifugaron. Para determinar la concentración de glutatión reducido, se añadieron 10 µL de sobrenadante y 10 µL de solución de DTNB a 80 µL de solución Tris-Cl 1 M en una microplaca. Después de 3 minutos, se midieron las absorbancias a 412 nm y se determinó la concentración de glutatión a partir de la curva estándar.

Construcción de cepas mutantes. Las mutaciones como insertos en trxB o gor en la cepa FA113 (Bessette *et al.* (1999) P.N.A.S. 96(24): 13703-8) se trasladaron a la cepa A19 mediante la transducción P1 siguiendo los procedimientos estándar (Miller (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. p. 263-364. Cold Spring Harbor Press, NY.)

## 25 Resultados

Se prepararon 210 µL de mezcla de reacción y se incubaron en el reactor semicontinuo representado en la figura 1. Se extrajeron muestras de 10 µL durante la incubación para determinar la cantidad de proteína sintetizada (mostrada en la figura 2, círculos blancos). A la vez, se tomaron muestras de 20 µL para la medición de la actividad de serina proteasa (cuadrados blancos, reacción sin plásmido; cuadrados negros, reacción con el plásmido pK7UK).

Para monitorizar el cambio en el potencial redox, se tomaron muestras de 10 µL de la mezcla de reacción y la solución de reserva. Las concentraciones de glutatión reducido se midieron tal como se describe en materiales y métodos. Las concentraciones de glutatión oxidado se estimaron en base a las concentraciones iniciales y las cantidades medidas de glutatión reducido. Los resultados se muestran en la figura 3. Las concentraciones iniciales de glutatión reducido y oxidado fueron 1 mM y 4 mM, respectivamente.

Para monitorizar la evolución con el tiempo del glutatión reducido en una reacción discontinua, durante la incubación de una reacción discontinua con 150 µL, se tomaron muestras de 10 µL en puntos de tiempo determinados, se trataron con una solución de TCA, y se determinaron las concentraciones. Las concentraciones de glutatión reducido se midieron tal como se describe en materiales y métodos. Las concentraciones de glutatión oxidado se estimaron en base a las concentraciones iniciales y las cantidades medidas de glutatión reducido. Los resultados se muestran en la figura 4. Las concentraciones iniciales de glutatión reducido y oxidado fueron 1 mM y 4 mM, respectivamente.

Para determinar los efectos de diferentes cepas en la reducción de glutatión, se prepararon extractos celulares a partir de las cepas mutantes indicadas en la figura 5, y se incubaron con la mezcla de reacción. Se tomaron muestras de 10 µL en puntos de tiempo determinados, se trataron con una solución de TCA, y se determinaron las concentraciones de GSH tal como se ha descrito anteriormente. Los extractos celulares se prepararon mediante sonicación breve de pasta celular resuspendida en tampón S30. Las concentraciones totales de proteínas celulares en las mezclas de reacción fueron 6,8 (A19); 5,2 (A19 trxB); 5,5 (A19 gor); y 5,4 (FA113) mg/mL, respectivamente. En experimentos con el extracto celular A19 utilizado para la síntesis de proteínas, la concentración de proteína celular fue 10,8 mg/mL.

La expresión de uroquinasa se determinó a partir del extracto tratado con IAA, tal como se muestra en la figura 6. El plásmido pK7UK se trató en las mezclas de reacción estándar que contenía extracto celular normal o tratado con IAA. Después de 1 hora de incubación, se midió la cantidad de radioactividad insoluble en TCA tal como se describe en los métodos experimentales.

En la figura 7 se muestra la evolución con el tiempo de la reducción de glutatión y la actividad enzimática de la proteína expresada en una reacción discontinua. Se expresó el plásmido pK7UK en una mezcla de reacción de 450 µL que contenía extracto S30 sin tratar o tratado con IAA y tampón de glutatión 5 mM (1mM de forma reducida y 4 mM de forma oxidada). En los puntos de tiempo indicados, se extrajeron muestras de 40 µL y se analizó la concentración de GSH (cuadro A) y la actividad enzimática (cuadro B) tal como se describe en Materiales y Métodos. Círculos blancos, reacción con extracto celular normal; círculos negros, reacción con extracto celular tratado con IAA.

En la figura 8, se muestra el efecto de PDI o dsbC en la velocidad de síntesis de proteínas activas. A una reacción con extracto celular tratado con IAA, se añadieron 133 µg/mL de dsbC o 27 µg/mL de PDI. Se tomaron muestras de 20 µL durante la incubación y se midieron las actividades enzimáticas tal como se ha descrito. Círculos blancos (reacción de control sin foldasa); círculos negros (adición de PDI); cuadrados negros (adición de DsbC).

**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 al respecto.

**Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- **Richardson et al.** *Trends Biochem. Sci.*, 1998, vol. 23, 138-143 [0007]
- **Bukau et al.** *Cell*, 1998, vol. 92, 351-366 [0007]
- **Kim; Swartz.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 66, 180-188 [0011]
- **Kim; Swartz.** *Biotechnol. Prog.*, 2000, vol. 16, 385-390 [0011]
- **Noren et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 182-188 [0011]
- **Merk et al.** *J. Biochem.*, 1999, vol. 125, 328-333 [0012]
- **Qu; Green.** *DNA and Cell Biology*, 1995, vol. 14 (9), 741-751 [0013]
- **Ryabova et al.** *Nature Biotech.*, 1997, vol. 15, 79-84 [0014]
- Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. Pratt. *Transcription and Translation: A Practical Approach*. *IRL Press*, 1984, 179-209 [0036]
- **Kudlicki et al.** *Anal Biochem*, 1992, vol. 206 (2), 389-93 [0036]
- **Arigoni et al.** *Nat Biotechnol*, 1998, vol. 16 (9), 851-6 [0041]
- **Hoang et al.** *Gene*, 1998, vol. 212, 77-86 [0042]
- **Missiakas et al.** *EMBO J*, 1994, vol. 13, 2013-2020 [0049]
- **Chen et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 19601-19605 [0049]
- **Joly et al.** *P.N.A.S.*, 1998, vol. 95, 2773-2777 [0049]
- **Roberts et al.** *P.N.A.S.*, 1973, vol. 70, 2330 [0054]
- **Pelham et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1976, vol. 67, 247 [0054]
- **Davanloo et al.** *P.N.A.S.*, 1984, vol. 81, 2035-2039 [0070]
- Coupled Transcription-Translation in Prokaryotic Cell-free Systems. Pratt.
- *Transcription and Translation: a Practical Approach*. *IRL Press*, 1984, 179-209 [0071]
- **Kim et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 239, 881-886 [0074]
- **Bessette et al.** *P.N.A.S.*, 1999, vol. 96 (24), 13703-8 [0077]
- **Miller.** *A Short Course in Bacterial Genetics*. *Cold Spring Harbor Press*, 1992, 263-364 [0077]

# REIVINDICACIONES

1. Método para la síntesis *in vitro* mejorada de polipéptidos plegados correctamente que comprenden uno o más enlaces disulfuro, comprendiendo la mejora:

sintetizar dicho polipéptido en una mezcla de reacción que comprende un extracto biológico que ha sido tratado previamente con un agente desactivante de sulfhidrilo que alquila o acetila los grupos sulfhidrilo libres; y un tampón redox comprende uno o más de glutatión, ditioneitol, ditioneitol,  $\beta$ -mercaptoetanol, tioglicolato y cisteína.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho agente desactivante de sulfhidrilo se selecciona del grupo que consiste en yodoacetamida, N-etil maleimida, yodoacetato, y N-yodoacetil-N'-(5-sulfónico-1-naftil)etilen diamina.

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho agente desactivante de sulfhidrilo es yodoacetamida.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho tampón redox comprende una mezcla de glutatión oxidado y reducido.

5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha mezcla se encuentra en una proporción de 4:1 de oxidado con respecto a reducido.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho extracto biológico deriva de una célula bacteriana que ha sido modificada genéticamente para desactivar una o más enzimas reductoras.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha una o más enzimas incluyen tioredoxin reductasa y glutatión reductasa.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha mezcla de reacción comprende además una o más enzimas que mejoran el plegamiento de polipéptidos o la generación de enlaces disulfuro.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha una o más enzimas que mejoran el plegamiento de polipéptidos o la generación de enlaces di sulfuro son enzimas foldasas.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha enzima foldasa se selecciona del grupo que consiste en DsbA, B, C, D, PDI, GroEL/ES, DnaK, DnaJ, GrpE, BIP y ciclofilinas, tales como PPI.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha foldasa es DsbC.

12. Método según la reivindicación 10, en el que dicha foldasa es PDI.

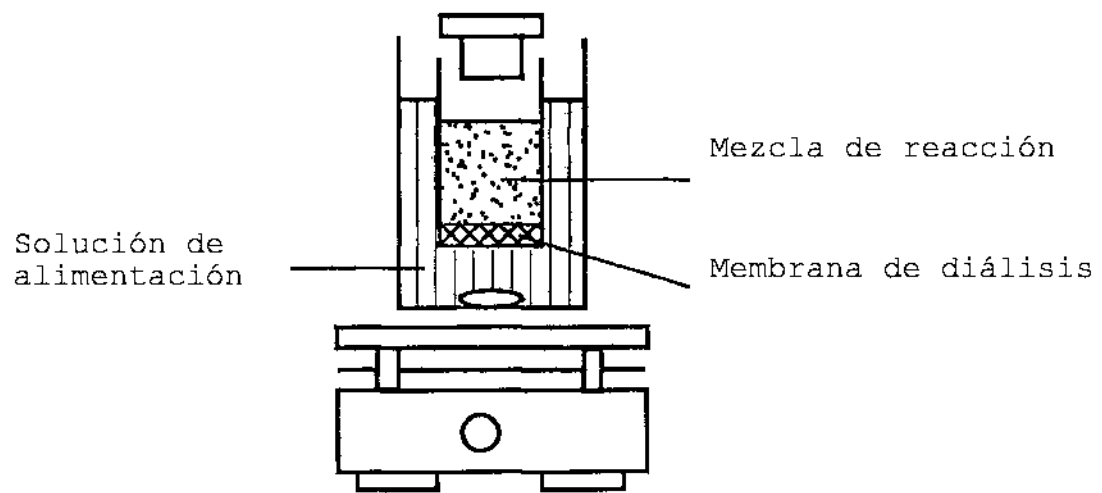


FIGURA 1

FIGURA 2

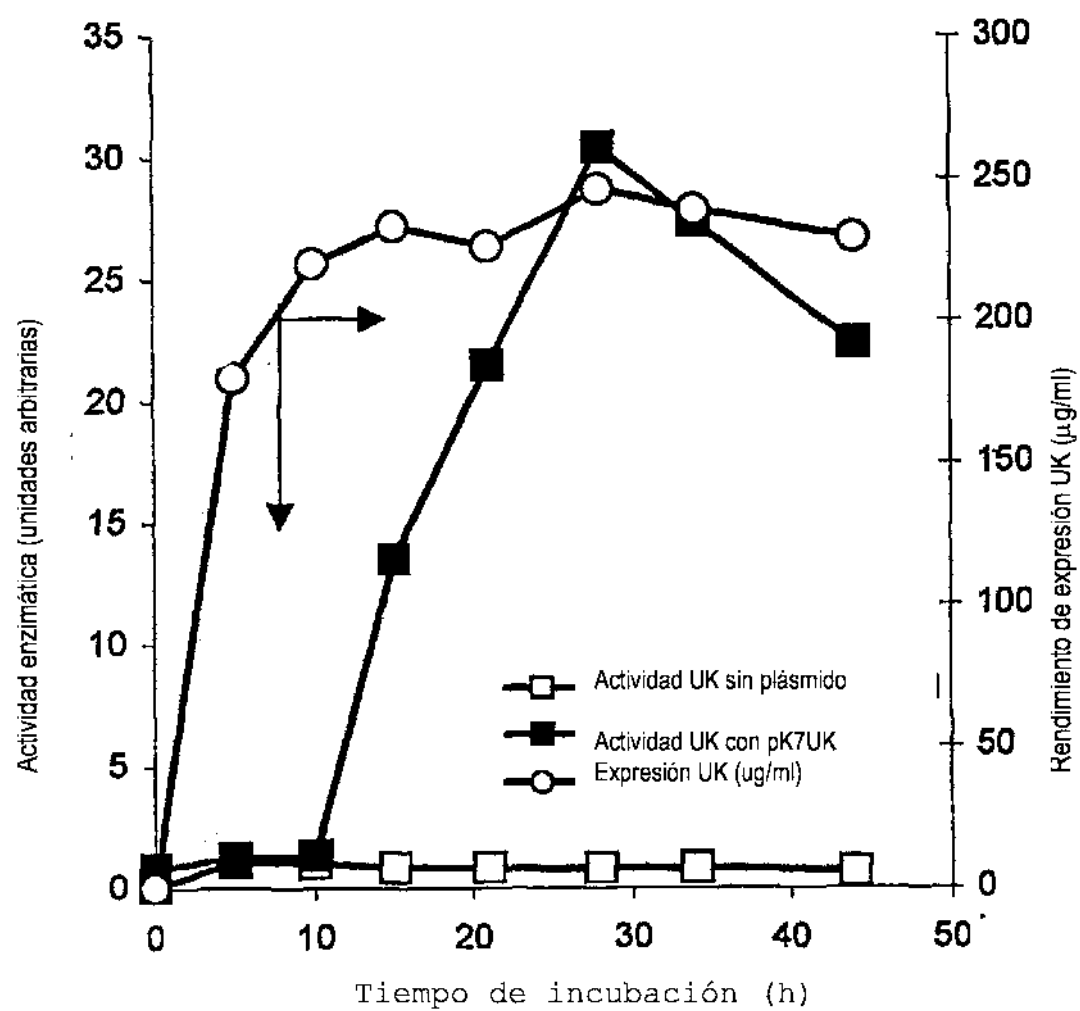


FIGURA 3

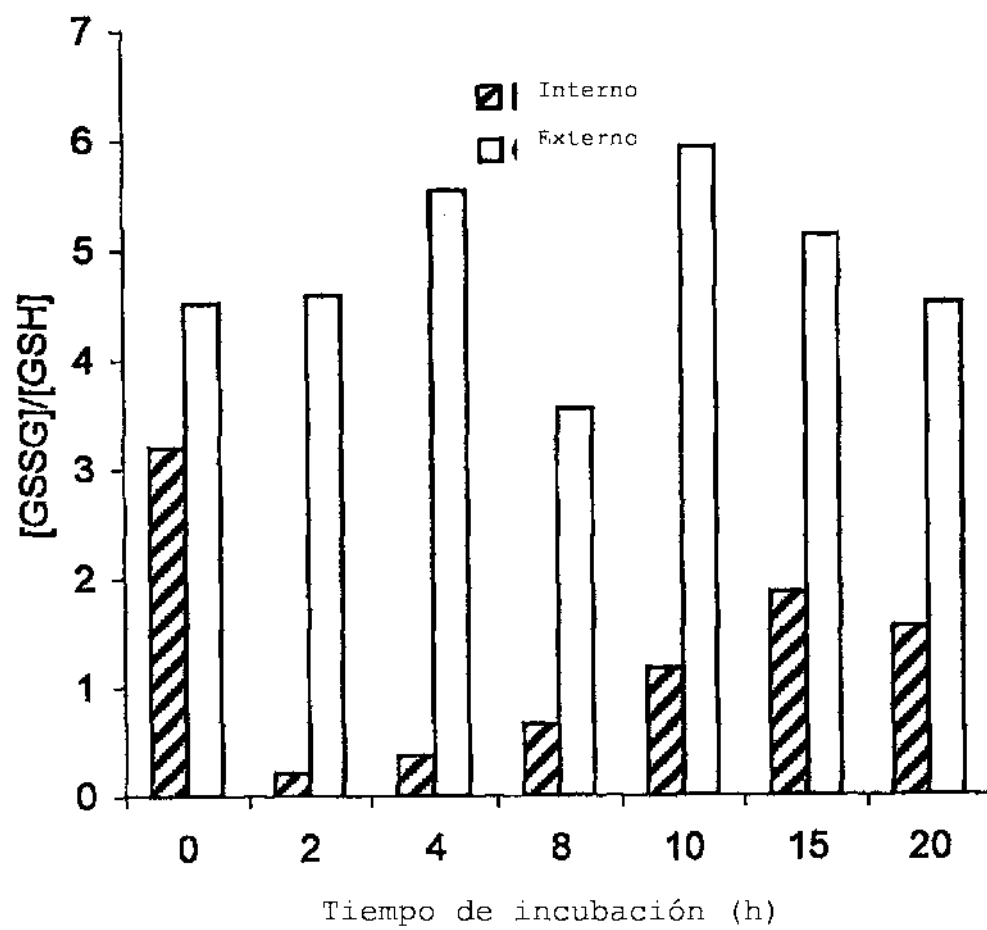


FIGURA 4

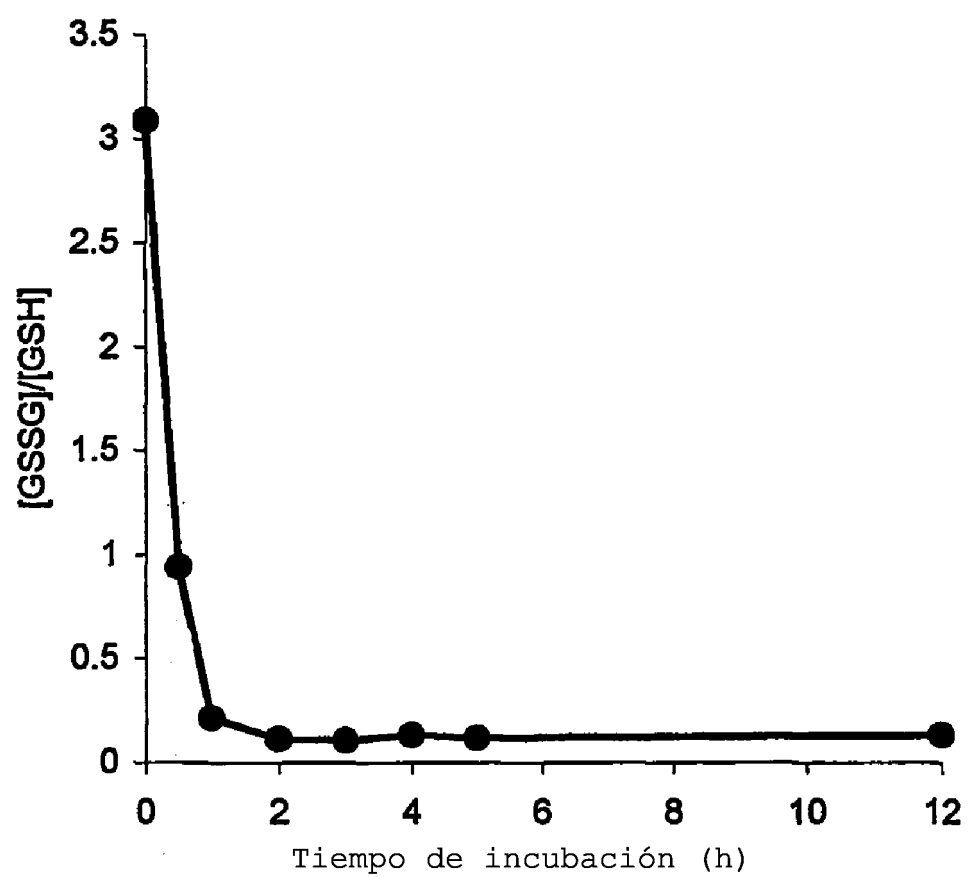


FIGURA 5

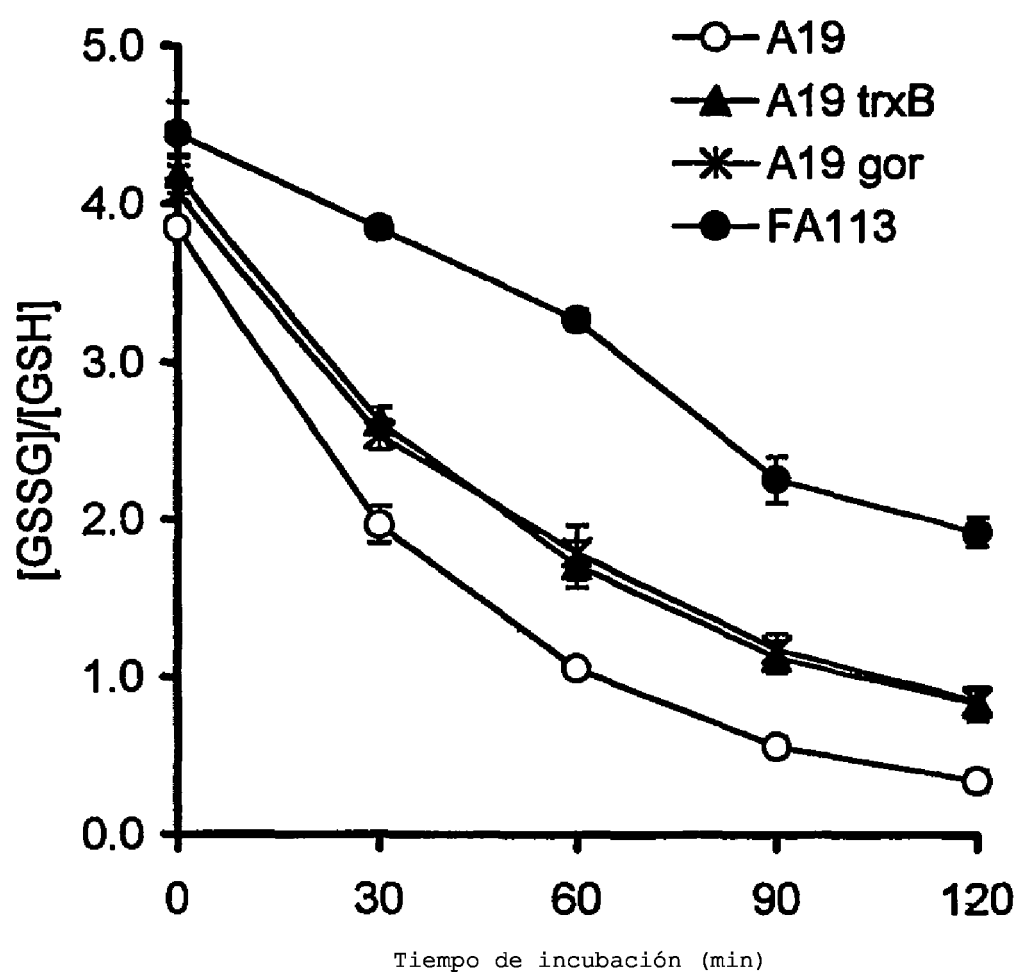


FIGURA 6

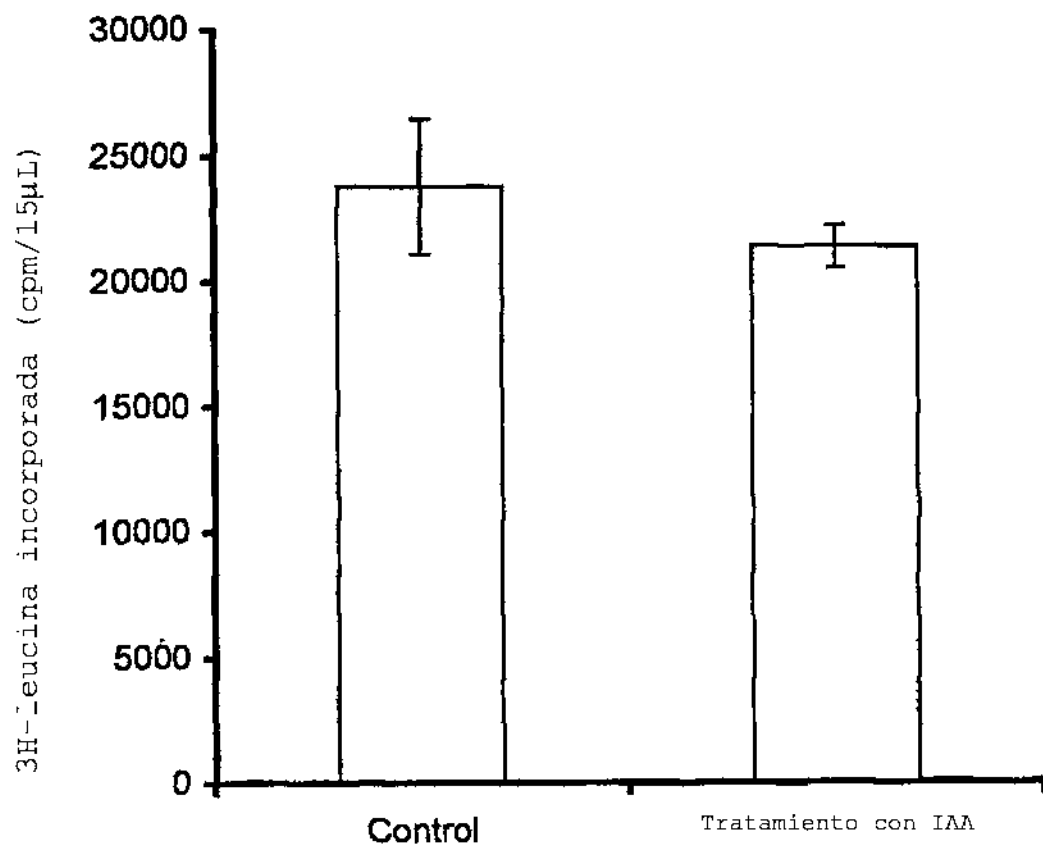


FIGURA 7A

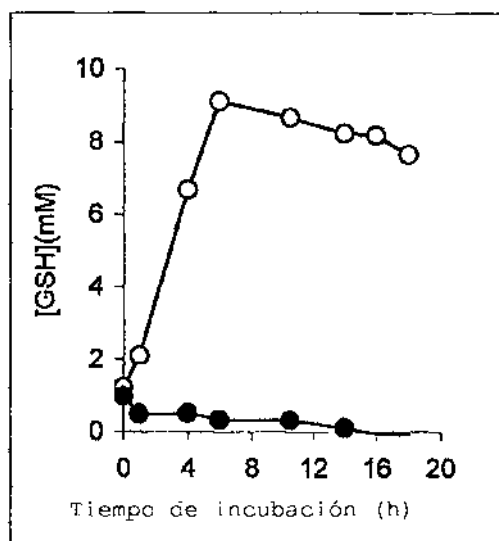


FIGURA 7B

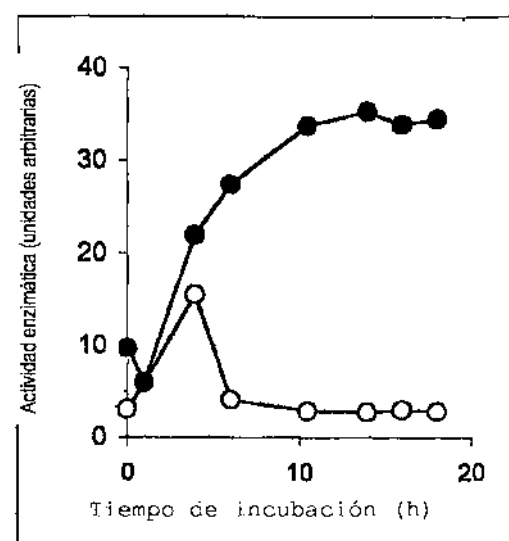


FIGURA 8

