



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715360-0 A2



\* B R P I 0 7 1 5 3 6 0 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 21/07/2007  
(43) Data da Publicação: 18/06/2013  
(RPI 2215)

(51) Int.Cl.:  
C12P 21/06  
C12N 9/14  
C12N 9/64

(54) **Título:** MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE; MÉTODO PRA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA 2086 MENINGOCÓCICA RECOMBINANTE (P2086); E COMPOSIÇÃO

(30) **Prioridade Unionista:** 27/07/2006 US 833,479

(73) **Titular(es):** Wyeth

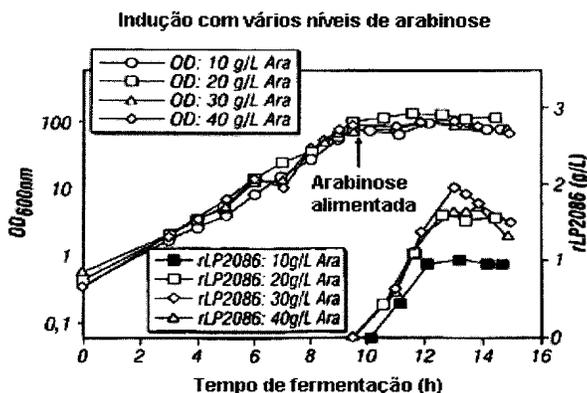
(72) **Inventor(es):** Wei-Qiang Willie Sun

(74) **Procurador(es):** Trench, Rossi e Watanabe

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007016917 de 21/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/013943de 31/01/2008

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE; MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA 2086 MENINGOCÓCICA RECOMBINANTE (P2086); E COMPOSIÇÃO. Apresentam-se métodos para a produção de proteínas, por exemplo, proteínas 2086 meningocócicas recombinantes, usando fermentação por batelada alimentada com entrada contínua de um indutor depois de se atingir um parâmetro de limiar e, opcionalmente, a entrada contínua de uma fonte de carbono, por exemplo, uma entrada a taxa constante, para melhorar os rendimentos de proteína, assim como composições de proteínas de alta densidade e composições para uso nos métodos da presente invenção.



"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE; MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA 2086 MENINGOCÓCICA RECOMBINANTE (P2086); E COMPOSIÇÃO".

#### Pedidos Relacionados

5 Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente  
Provisória nº de série U.S. 60/833.479, intitulado "HIGH-  
CELL DENSITY FED-BATCH FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCING  
RECOMBINANT PROTEIN", depositado em 27 de julho de 2006,  
cujo teor está incorporado integralmente ao presente à guisa  
10 de referência.

#### Campo da Invenção

Este pedido refere-se, genericamente, a novos métodos de fermentação por batelada alimentada que proporcionam uma melhor expressão de proteínas em sistemas bacterianos, assim como a composições de proteínas de alta densidade e a composições que são usadas nos novos métodos de fermentação por batelada alimentada.

#### Fundamentos da Invenção

Várias estratégias de fermentação foram usadas para produzir proteínas em quantidades suficientes para uso laboratorial, clínico ou comercial. A fermentação por batelada alimentada foi usada para proporcionar maiores rendimentos de proteínas com relação aos conseguidos por métodos de fermentação por bateladas simples. A fermentação por batelada alimentada é um processo em que, após uma fase de batelada inicial, ocorre uma fase em que um ou mais nutrientes são supridos à cultura por alimentação.

Genericamente, durante a fase de batelada, as células são inicialmente cultivadas até uma concentração desejada. Nessa fase, o crescimento celular é amplificado, e, em geral, nenhuma proteína alvo é produzida, a menos que se adicione um indutor, como arabinose, lactose ou isopropil beta-D-tiogalactosida (IPTG), dependendo do promotor, ou haja algum vazamento do promotor. Durante a fase de alimentação, a fonte de carbono e outras exigências são tipicamente alimentadas a um fermentador em uma corrente líquida relativamente concentrada a uma certa taxa de alimentação. Uma vez que uma densidade celular alvo seja atingida, começa-se a alimentação com o indutor ou com indutor e outros nutrientes. Nessa fase, a ênfase é na produção de proteínas pelas células cultivadas. O substrato (isto é, os nutrientes e o indutor) que é alimentado ao fermentador é, nesse estágio, usado genericamente para crescimento celular e síntese de produto. O crescimento celular é controlado pela taxa de alimentação, para se obter um crescimento celular e uma produção de proteína ótimos. Durante o estágio de produção de proteínas, um indutor tem de ser adicionado para organismos recombinantes.

A expressão de proteínas em um meio compreendendo uma fonte de carbono comum, como glicose ou outra fonte de carbono à base de açúcar, e um indutor é satisfatória até que surjam condições limitativas ao término da fase de alimentação. Exemplos de condições limitativas incluem concentração reduzida de oxigênio, nutrientes reduzidos,

como vitaminas, carbono, nitrogênio, e acúmulo de compostos tóxicos no meio de crescimento.

Estratégias de fermentação por batelada alimentada freqüentemente envolvem diferentes formas de controle por retroalimentação, incluindo retroalimentação indireta e direta para controlar o suprimento de nutrientes. Um desses métodos de fermentação por batelada alimentada envolve a aplicação de um algoritmo de controle de retroalimentação por alimentação dos nutrientes para controlar um parâmetro de processo em um momento definido. Por exemplo, o controle direto da alimentação pode se basear na medição da concentração do nutriente. O controle de retroalimentação é, então, diretamente relacionado à atividade celular durante toda a fermentação. Parâmetros de controle que foram usados para controle de retroalimentação de fermentações incluem o valor de pH, densidade celular medida on line ou tensão de oxigênio dissolvido (DOT).

Entretanto, a aplicação de algoritmos de retroalimentação é acompanhada por inúmeras desvantagens. Uma dessas desvantagens é que a taxa de alimentação depende de parâmetros de processo atuais. Qualquer perturbação no processo pode afetar o parâmetro, distorcendo, assim, a taxa de alimentação e o rendimento de proteína resultante. Essas desvantagens são amplificadas quando o processo é escalonado para produzir maiores quantidades de proteína.

Outra desvantagem de estratégias de batelada alimentada anteriormente empregadas é que, quando se usa controle de retroalimentação, a taxa de crescimento

específica não pode ser predefinida ou controlada com exatidão, resultando em rendimentos subótimos nos processos, quando a formação de produto é dependente do crescimento.

Além disso, quando o fluxo de carbono (por exemplo, alta concentração de glicose) para a via metabólica central excede a capacidade máxima do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), podem-se acumular subprodutos. O acúmulo de subprodutos poderia inibir o crescimento celular e a produção de proteínas durante a fermentação.

Além do mais, as várias deficiências dos métodos de fermentação por batelada alimentada frequentemente resultam em um uso ineficiente dos componentes nutrientes. Assim, os métodos podem ser economicamente desvantajosos, particularmente para produção comercial de proteínas em grande escala.

As abordagens anteriores de expressão de proteínas recombinantes mediante fermentação por batelada alimentada, conforme acima descritas, têm várias deficiências. Dada a importância da produção eficiente em termos de custo de quantidades suficientes de proteínas para várias finalidades, há necessidade de um método de fermentação por batelada alimentada eficiente que resulte em maior crescimento celular, maior formação de produto (isto é, maior rendimento de proteína) e menor acúmulo de subprodutos.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção se refere a novos métodos de fermentação por batelada alimentada para a produção de

rendimentos inesperadamente altos de proteínas recombinantes.

Uma modalidade da presente invenção apresenta um método para a produção de uma proteína recombinante compreendendo: o cultivo de uma célula bacteriana recombinante para expressar uma proteína recombinante compreendendo a adição contínua de uma fonte de carbono a uma cultura compreendendo a célula bacteriana recombinante e a adição contínua de um indutor à cultura após a cultura atingir um parâmetro de limiar; e o isolamento da proteína recombinante da cultura celular.

Uma modalidade adicional da presente invenção apresenta um método para a produção de uma proteína recombinante compreendendo: (a) a introdução em uma célula hospedeira bacteriana de um vetor de expressão que codifique uma proteína recombinante sob o controle de um promotor induzível para formar uma célula bacteriana recombinante; (b) a introdução da célula bacteriana recombinante em um meio de cultura para formar uma cultura celular; (c) a adição de uma fonte de carbono à cultura celular como uma alimentação contínua; (d) a monitorização do crescimento celular na cultura celular quanto a atingir uma densidade óptica de limiar ( $OD_{600}$ ); (e) a adição de um indutor do promotor induzível à cultura celular como uma alimentação contínua uma vez que a densidade óptica de limiar ( $OD_{600}$ ) seja atingida; e (f) a colheita da proteína recombinante da cultura celular.

Ainda outra modalidade da presente invenção apresenta um método para a produção de uma proteína recombinante compreendendo: o cultivo de uma célula bacteriana recombinante para expressar uma proteína recombinante por adição contínua de um indutor a uma cultura compreendendo a célula bacteriana após a cultura atingir um parâmetro de limiar, em que a célula bacteriana compreende uma sequência de ácido nucléico correspondente a um gene de *N. meningitidis* sorogrupo B.

10 De acordo com ainda outra modalidade, a presente invenção apresenta um método para a produção de uma proteína 2086 recombinante (rP2086) compreendendo: (a) a introdução em uma célula hospedeira bacteriana de um vetor de expressão que codifique uma proteína 2086 meningocócica recombinante  
15 sob o controle de um promotor induzível para formar uma célula bacteriana recombinante; (b) a introdução da célula bacteriana recombinante em um meio de cultura para formar uma cultura; (c) a adição de uma fonte de carbono à cultura; (d) a monitorização do crescimento celular na cultura quanto  
20 a atingir uma densidade óptica de limiar (OD); (e) a adição contínua de um indutor do promotor induzível à cultura uma vez que a densidade celular da cultura atinja uma densidade óptica de cerca de 70 a 110; e (f) a colheita da proteína 2086 meningocócica recombinante da cultura após cerca de 3  
25 horas a cerca de 6 horas depois do início da adição contínua do indutor.

De acordo com outra modalidade, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo: uma cultura

bacteriana compreendendo uma proteína 2086 recombinante (rP2086) a uma densidade de pelo menos cerca de 1,5 g/L com base no volume total da cultura bacteriana.

De acordo com ainda outra modalidade, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo: um meio de cultura bacteriana compreendendo uma proteína 2086 meningocócica recombinante (rP2086) preparada de acordo com os métodos da presente invenção.

#### Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: Fermentação por batelada alimentada a várias taxas de alimentação constantes, sem indução.

Figura 2: Fermentação por batelada alimentada a várias taxas de alimentação constantes, sem indução.

Figura 3: Indução a várias densidades ópticas.

Figura 4: Indução com vários níveis de arabinose.

Figura 5: Efeitos do método de adição de arabinose sobre o rendimento de rLP2086.

Figura 6: Efeito da taxa de alimentação de arabinose sobre a produção de rLP2086.

Figura 7: Efeito do tempo de indução sobre a expressão.

Figura 8: Fermentação por batelada alimentada para produção de rLP2086 subfamília B.

Figuras 9a e 9b: SDS-PAGE e Western Blot da indução de rLP2086 subfamília B, respectivamente.

Figura 10: Fermentação por batelada alimentada para produção de rLP2086 subfamília A.

Figuras 11a e 11b: SDS-PAGE e Western Blot da indução de rLP2086 subfamília A, respectivamente.

Figuras 12a, 12b e 12c: Alimentação dupla de glicose e arabinose durante a indução.

5                    Figura 13a: fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília B de E. coli a uma escala de 100 L.

Figura 13b: fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília A de E. coli a uma escala de 100 L.

10                    Figura 14a: fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília B de E. coli com alimentação dupla de glicose e arabinose a uma escala de 100 L.

Figura 14b: fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília A de E. coli com alimentação dupla de glicose e arabinose a uma escala de 100 L.

15                    Descrição Detalhada da Invenção

Os métodos da presente invenção se baseiam na descoberta surpreendente de que rendimentos de proteína inesperadamente altos são obtidos por fermentação por batelada alimentada com alimentação contínua de um indutor durante a indução em um meio de cultura. Opcionalmente, uma fonte de carbono é continuamente alimentada antes da e/ou durante a alimentação contínua de indutor. Quando induzido por arabinose, cerca de 2 - 3 g/L de uma lipoproteína 2086 recombinante (rLP2086) (que é expressa por um microorganismo com uma sequência correspondendo ao gene 2086 gene em N. meningitidis sorogrupo B) foram produzidos de acordo com uma modalidade da invenção. Isso representa um aumento de aproximadamente 2 a 3 vezes no rendimento de rLP2086 por

fermentação por batelada alimentada para ambas as subfamílias A e B da proteína 2086 em comparação com um processo de fermentação por batelada comparativo. Além disso, os métodos da presente invenção são prontamente adaptáveis à produção em escala comercial dessas e de outras proteínas.

Para fins de promover um entendimento das modalidades aqui descritas, será feita referência a várias modalidades, e uma linguagem específica será usada para descrevê-las. A terminologia aqui usada é apenas para fins de descrever modalidades particulares e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção. Conforme usadas nesta exposição, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência plural, a menos que o contexto claramente determine de outra forma. Da mesma forma, as formas singulares de termos como "meio" incluem a referência ao plural "meios" e vice-versa. Assim, por exemplo, uma referência a "um meio de cultura" inclui uma pluralidade desses meios, assim como um único meio; e uma referência a "meio de cultura" inclui uma pluralidade de meios, assim como um único meio.

O termo "indutor", conforme aqui usado, refere-se a qualquer agente que induza, intensifique ou promova a expressão de uma proteína recombinante, em que a expressão do gene sob o controle do promotor induzível possa ser diretamente regulado pela concentração desse agente.

O termo "fonte de carbono", conforme aqui usado, refere-se a uma fonte de carbono e energia para as células.

Os termos "alimentação", "alimentado", "alimentando" ou "adição contínua", conforme aqui usados de maneira intercambiável, referem-se à adição de uma substância continuamente durante um período de tempo, em vez de tudo de uma vez. Os termos consideram um início e/ou término únicos ou múltiplos pontos de partida e/ou parada para a adição contínua da substância durante um processo de fermentação.

O termo "proteína recombinante", conforme aqui usado, refere-se a qualquer proteína ou sua parte biologicamente ativa (por exemplo, uma parte que retenha atividade biológica da proteína completa) que não seja um gene repórter ou marcador (por exemplo, uma proteína fluorescente verde) expressada por material genético recombinante que codifique aminoácidos, incluindo peptídios, polipeptídios, proteínas, oligoproteínas e/ou proteínas de fusão. Um produto de proteína recombinante pode incluir um produto terapêutico, profilático ou diagnóstico.

#### Métodos da Presente Invenção:

Os métodos da presente invenção proporcionam rendimentos inesperadamente altos de proteína mediante um novo processo de fermentação por batelada alimentada envolvendo a adição contínua de um indutor, como arabinose, a um meio de cultura após a cultura atingir um parâmetro de limiar. Uma fonte de carbono, como glicose, é em geral adicionada a uma cultura compreendendo uma célula bacteriana recombinante antes da fase de indução. A fonte de carbono

pode ser alimentada juntamente com o indutor. O indutor também pode servir de fonte de carbono secundária.

Uma fonte de carbono, como glicose, é continuamente adicionada ao meio de cultura, antes e/ou durante a alimentação contínua do indutor ao meio de cultura, de acordo com uma modalidade da presente invenção. Assim, a alimentação contínua da fonte de carbono se superpõe à alimentação contínua do indutor, de acordo com uma modalidade. A alimentação contínua da fonte de carbono pode continuar durante toda a duração da alimentação contínua de indutor ou apenas durante parte(s) dessa duração. Em outra modalidade, a alimentação contínua da fonte de carbono não se superpõe à alimentação contínua do indutor. De acordo com uma modalidade da presente invenção, o indutor e/ou a fonte de carbono podem ser alimentados à cultura a uma taxa constante.

O processo de fermentação por batelada alimentada envolve várias etapas, resultando na produção da proteína desejada de acordo com uma modalidade da invenção. Em uma etapa inicial, um vetor de expressão que codifica um produto de proteína recombinante sob o controle de um promotor induzível é preparado e, então, é introduzido em uma célula hospedeira bacteriana. A célula hospedeira bacteriana é introduzida em um meio de cultura. Um indutor do promotor induzível é alimentado à cultura (isto é, o indutor é adicionado à cultura continuamente durante um período de tempo). O indutor pode ser alimentado à cultura a uma taxa constante. Então, o produto de proteína recombinante é

colhido da cultura. A proteína recombinante produzida dessa maneira pode ser, então, purificada conforme desejado e/ou usada de qualquer maneira adequada, como em uma formulação profilática, terapêutica ou diagnóstica.

5                   Uma alta densidade celular e um rendimento de  
proteína aumentado foram inesperadamente conseguidos pela  
fermentação por batelada alimentada com a alimentação a taxa  
constante de um indutor, o que proporciona um rendimento de  
produto de proteína recombinante aproximadamente 2 a 3 vezes  
10 maior em comparação com a fermentação por batelada, conforme  
ilustrado nos exemplos apresentados abaixo. Os métodos da  
presente invenção são aplicáveis a fermentação em grande  
escala, assim como a fermentação em pequena escala.  
Fermentação em "grande escala", conforme aqui usado, refere-  
15 se a fermentação em um fermentador que tenham pelo menos  
aproximadamente 1.000 L de capacidade volumétrica, isto é,  
volume de trabalho, deixando um espaço adequado para o  
espaço superior. Fermentação em "pequena escala" se refere  
20 aproximadamente 100 L de capacidade volumétrica, como 5 L,  
10 L, 50 L ou 100 L. Uma vantagem demonstrada do presente  
processo de fermentação por batelada alimentada é que pode  
ser utilizada para a produção de um produto de proteína  
recombinante na escala de fermentador de 5 a 10 L e ser  
25 escalonável para qualquer volume, por exemplo, 100 L, 150 L,  
250 L, 500 L, 1.000 L ou mais, sem limitação.

Indutores:

Os métodos aqui descritos se referem à produção de proteína recombinante, em que a expressão de proteína recombinante está sob o controle transcricional de um promotor induzível, pelo que a expressão do gene sob o controle do promotor induzível pode ser diretamente regulada pela concentração do indutor presente no meio de cultura. O indutor é continuamente fornecido ao meio de cultura, opcionalmente a uma taxa constante. O indutor é adicionado ao meio de cultura uma vez que um parâmetro de limiar tenha sido atingido. Por exemplo, uma proteína recombinante pode estar sob o controle do promotor araB (por exemplo, ParaB), que pode ser diretamente regulado pela concentração de arabinose que é adicionada a uma taxa constante ao meio de cultura. Indutores adequados para uso juntamente com a presente invenção são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Exemplos de indutores da presente invenção são apresentados abaixo, sem limitação.

Promotor	Indutor
Promotor de arabinose, como ParaB	Arabinose
Plasminogênio humano	Fator de Necrose Tumoral
Inibidor de Ativador tipo-1, Hpai-1	TNF
Citocromo P-450	Toxinas
Elemento Sensível a Metal CYP1A1, MRE	Metais Pesados, Mamário de Camundongo

Vírus de Tumor	Glicocorticóides
Colagenase	Éster de Forbol
Estromolisina	Éster de Forbol
SV40	Éster de Forbol
Proliferrina	Éster de Forbol
$\alpha$ -2-Macroglobulina	IL-6
Gene MX Murídeo	Interferon, Vírus da Doença de Newcastle
Vimectina	Soro
Estimulante de Tireóide	Hormônio Tireoidiano
Gene do Hormônio $\alpha$	HSP70 Ela, SV40 T Grande Antigênico
Fator de Necrose Tumoral	FMA
Interferon	Infecção viral, dsRNA
Somatostatina	AMP cíclico
Fibronectina	AMP cíclico
promotor/operador lac	IPTG

Fonte de Carbono:

Qualquer fonte de carbono adequada, por exemplo, glicerol, succinato, lactato, ou fonte de carbono à base de açúcar, por exemplo, glicose, lactose, sacarose e frutose, é considerada para uso na presente invenção, conforme será compreendido por aqueles versados na técnica. Por exemplo, fontes de carbono à base de açúcar que podem ser usadas na presente invenção incluem, sem limitação, polissacarídeos ramificados ou não ramificados que compreendam os monômeros sacarídicos D-manose, D- e L-galactose, fucose, frutose, D-

xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido siálico, ácido D-galacturônico, ácido D-manurônico (por exemplo, ácido polimanurônico ou ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glicose e ácido neuramínico, incluindo

5 homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, por exemplo, lactose, amilopectina, amido, hidroxietil amido, amilose, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicogênio, ou a subunidade polissacarídica de mucopolissacarídeos ácidos, por exemplo, ácido hialurônico; polímeros de álcoois de

10 açúcar, como polissorbitol e polimanitol; heparina ou heparano; ou quaisquer de suas combinações, sem limitação. A glicose é a fonte de carbono primária de acordo com uma modalidade da invenção. Arabinose, quando usada como o indutor, também pode servir de fonte de carbono secundária,

15 embora também possa ser a fonte de carbono primária. De acordo com uma modalidade, as fontes de carbono incluem qualquer um de D-glicose, L-arabinose, sacarose, I-inositol, D-manitol,  $\beta$ -D-frutose,  $\alpha$ -L ramnose, D-xilose, celulose, ou qualquer de suas combinações. Uma ou mais de uma fonte de

20 carbono pode ser usada na presente invenção.

#### Sistemas de Expressão Bacteriana e Plasmídios:

Esta invenção também apresenta células bacterianas recombinantes compreendendo um vetor de expressão, como um plasmídio, compreendendo uma sequência de controle de

25 expressão com sequências promotoras e sequências iniciadoras e uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo desejado, a sequência de nucleotídeos estando localizada de 3' para as sequências promotoras e iniciadoras. Consideram-

se quaisquer sequências de controle de expressão e células hospedeiras/veículos de clonagem adequados, conforme seria sabido por alguém versado na técnica com base na exposição aqui apresentada.

5                    Sequências de controle de expressão e combinações  
de célula hospedeira/veículo de clonagem adequadas são bem  
conhecidas na técnica e estão descritas, a título de  
exemplo, em Sambrook, J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989,  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor  
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Genericamente,  
10 técnicas de DNA recombinante envolvem a obtenção, por  
síntese ou isolamento, de uma sequência de DNA que codifique  
a proteína recombinante de interesse, e sua introdução em um  
sistema de expressão vetor/célula hospedeira apropriado,  
15 onde é expresso, de preferência sob o controle de um  
promotor induzível por arabinose. Qualquer um dos métodos  
descritos para a inserção de DNA em um vetor de expressão  
pode ser usado para ligar um promotor e outros elementos de  
controle reguladores em sítios específicos dentro do vetor  
20 recombinante selecionado. Células hospedeiras adequadas são,  
então, transformadas, infectadas, transduzidas ou  
transfectadas com esses vetores ou plasmídios por técnicas  
convencionais.

Vários sistemas de célula hospedeira-vetor  
25 (plasmídio) podem ser usados para expressar a proteína  
recombinante de interesse. O sistema de vetor, como, por  
exemplo, um sistema incluindo promotor induzível por  
arabinose, é compatível com a célula hospedeira usada. O DNA

que codifica o produto de proteína recombinante de interesse é inserido em um sistema de expressão, e o promotor (de preferência o promotor induzível por arabinose) e outros elementos de controle são ligados em sítios específicos dentro do vetor, de modo que, quando o vetor é inserido em uma célula hospedeira (por transformação, transdução ou transfecção, dependendo do sistema célula hospedeira-vetor usado), o DNA que codifica o produto de proteína recombinante de interesse é expresso pela célula hospedeira.

O vetor pode ser selecionado de um dos vetores virais ou vetores não virais acima descritas, mas tem de ser compatível com a célula hospedeira usada. O vetor de DNA recombinante pode ser introduzido em células hospedeiras apropriadas (bactérias, vírus, levedura, células de mamíferos ou outras) por transformação, transdução ou transfecção e outros (dependendo do sistema vetor/célula hospedeira). Sistemas hospedeiro-vetor incluem, mas não se limitam a, bactérias transformadas com DNA de bacteriófago, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo.

A expressão em procariotos do produto de proteína recombinante de interesse pode ser realizada em qualquer espécie adequada ou cepa de bactéria, como *E. coli*, com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis que direcionem a expressão de proteínas de fusão ou de não fusão.

Vetores de fusão acrescentam um número de aminoácidos a uma proteína codificada, na terminação amino ou carbóxi da proteína recombinante. Esses vetores de fusão

servem tipicamente a três finalidades: 1) aumentar a expressão da proteína recombinante; 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante; e 3) auxiliar na purificação da proteína recombinante por ação como um ligante em purificação por afinidade. Frequentemente, em vetores de expressão de fusão, introduz-se um sítio de clivagem proteolítica na junção da fração de fusão com a proteína recombinante para permitir a separação da proteína recombinante da fração de fusão após a purificação da proteína de fusão. Essas enzimas, e suas sequências de reconhecimento cognatas, incluem Fator Xa, trombina e enteroquinase.

Vetores de expressão de fusão típicos incluem P<sub>gex</sub> (Pharmacia Biotech Inc; Smith e Johnson, 1988), P<sub>mal</sub> (New England Biolabs, Beverly; Mass.) e P<sub>rit5</sub> (Pharmacia, Piscataway, N.J.), que fundem glutathione S-transferase (GST), proteína de ligação E a maltose ou proteína A, respectivamente, à proteína recombinante alvo.

Exemplos de vetores de expressão em *E. coli* de não fusão induzível adequados incluem p<sub>Trc</sub> (Amann et al. (1988) Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*, *Gene*, 69, 301-315), e Pet<sub>Iid</sub> (Studier et al. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods in Enzymology*, 185, 60-89). A expressão do gene alvo pelo vetor p<sub>Trc</sub> se baseia na transcrição de RNA polimerase do hospedeiro a partir de um promotor de fusão trp-lac híbrido. A expressão do gene alvo pelo vetor Pet<sub>Iid</sub>

se baseia na transcrição a partir de um promotor de fusão T7 gnl 0-lac mediada por uma RNA polimerase viral coexpressa J7 gnl. Essa polimerase viral é suprida por cepas hospedeiras BL21 (DE3) ou HMS I 74(DE3) de um pró-fago residente portador de um gene T7 gnl sob o controle transcricional do promotor lacUV 5.

A sequência reguladora do construto de vetor é um promotor induzível de acordo com uma modalidade. O uso de um promotor induzível permitirá que baixos níveis basais de proteína ativada sejam produzidos pela célula durante o cultivo de rotina e adição de expansão. Subsequentemente, as células podem ser, então, induzidas a expressar grandes quantidades da proteína desejada durante a produção ou triagem. O promotor induzível pode ser isolado de genomas celulares ou virais.

Promotores induzíveis que são regulados por compostos supridos exogenamente incluem, sem limitação, o promotor de arabinose, o promotor de metalotionina de ovelha induzível por zinco (MT), o promotor do vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV) induzível por dexametasona (Dex), o sistema promotor de T7 polimerase (WO 98/10088); o promotor de inseto ecdisona (No et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351), o sistema repressível por tetraciclina (Gossen et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551), o sistema induzível por tetraciclina (Gossen et al., 1995 Science, 268:1766-1769, veja também Harvey et al., 1998 Curr. Opin. Chem Biol, 2:512-518), o sistema induzível por RU486 (Wang et al., 1997 Nat.

Biotech., 15:239-243 e Wang et al., 1997 Gene Ther., 4:432-441) e o sistema induzível por rapamicina (Magari et al., 1997 J. Clin. Invest., 100: 2865-2872). De acordo com uma modalidade da invenção, o promotor é um promotor induzível por arabinose.

Qualquer célula hospedeira bacteriana adequada é considerada para uso na presente invenção, conforme seria compreendido por aqueles versados na técnica com base na exposição aqui apresentada. Por exemplo, bactérias adequadas para essa finalidade incluem Escherichia, Enterobacter, Azotobacter, Erwinia, Bacillus, Pseudomonas, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Serratia, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, Paracoccus, ou uma combinação delas, sem limitação. Qualquer cepa adequada de qualquer uma dessas bactérias adequadas também é considerada pela presente invenção. Além disso, o uso de células mutantes adequadas, conforme seria reconhecido por aqueles versados na técnica, também é considerado pela presente invenção. Aqueles versados na técnica seriam prontamente capazes de selecionar uma célula hospedeira apropriada para usar sob circunstâncias específicas mediante a orientação aqui apresentada.

Exemplos de vetores de expressão em E. coli induzíveis adequados incluem, sem limitação, pTrc (Amann et al., 1988 Gene, 69:301-315), os vetores de expressão de arabinose (por exemplo, Pbad18, Guzman et al., 1995 J. Bacteriol., 177:4121-4130), e pETIId (Studier et al., 1990 Methods in Enzymology, 185:60-89). A expressão do gene alvo

pelo vetor pTrc se baseia na transcrição de RNA polimerase do hospedeiro a partir de um promotor de fusão trp-lac híbrido. A expressão do gene alvo pelo vetor pETIIId se baseia na transcrição a partir de um promotor de fusão T7 gn10-lac mediada por uma RNA polimerase viral coexpressa T7 gn 1. Essa polimerase viral é suprida por cepas hospedeiras BL21 (DE3) ou HMS I 74(DE3) a partir de um pró-fago residente portador de um gene T7 gn1 sob o controle transcricional do promotor lacUV5. O sistema P<sub>BAD</sub> se baseia no promotor de arabinose induzível que é regulado pelo gene araC. O promotor é induzido na presença de arabinose.

Outras modalidades da presente invenção utilizam vetores de expressão regulados por arabinose ou vetores em que a expressão da proteína recombinante de interesse esteja sob o controle do promotor de arabinose, por exemplo, o promotor para o óperon de arabinose de E. coli, P<sub>BAD</sub> ou P<sub>ARA</sub>, sem limitação.

Uma sequência de ácido nucléico (nucleotídeos) que codifique qualquer proteína desejada é considerada pela presente invenção. A sequência de nucleotídeos pode ser uma sequência de nucleotídeos de ocorrência natural completa ou parcial ou uma sequência de nucleotídeos alterada completa ou parcial, ou qualquer sequência que se hibridize a elas sob condições rigorosas. Referências aqui a sequências de ácidos nucléicos que correspondam a um gene se referem a qualquer sequência de ácido nucléico expressável como a proteína desejada.

Por exemplo, essas seqüências de ácidos nucléicos alteradas incluem uma deleção, substituição, incluindo transição e transversão, ou inserção de nucleotídio, e em que as ditas alterações podem ocorrer nas posições terminais 5' ou 3' da seqüência de nucleotídeos de referência ou em qualquer lugar entre essas posições terminais, intercaladas individualmente entre os nucleotídeos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da seqüência de referência. O número de alterações de nucleotídeos é determinado multiplicando-se o número total de nucleotídeos em qualquer seqüência pela porcentagem numérica da respectiva porcentagem de identidade (dividida por 100) e subtraindo-se esse produto do número total de nucleotídeos na dita seqüência.

Por exemplo, a presente invenção considera o uso de uma seqüência de nucleotídeos que tenha pelo menos 70% de identidade com uma certa seqüência de ácido nucléico; sua variante degenerada ou seu fragmento, em que a seqüência pode incluir até  $n_n$  alterações no ácido nucléico por toda a região polinucleotídica da seqüência de ácido nucléico, em que  $n_n$  é o número máximo de alterações e é calculado pela fórmula:

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y),$$

em que  $x_n$  é o número total de ácidos nucléicos de qualquer seqüência, e  $y$  tem um valor de 0,70, em que qualquer produto não inteiro de  $x_n$  e  $y$  é arredondado para baixo até o inteiro mais próximo antes de se subtrair esse produto de  $x_n$ . Evidentemente,  $y$  também pode ter um valor de

0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,94 para 94%,  
0,95 para 95%, 0,96 para 96%, 0,97 para 97%, 0,98 para 98%  
ou 0,99 para 99%, e assim por diante. Alterações de uma  
sequência podem criar mutações sem sentido, de sentido  
5 deturpado ou de deslocamento de quadro nessa sequência  
codificadora e, dessa forma, alterar o polipeptídeo  
codificado pelo polinucleotídeo após essas alterações.

A presente invenção considera o uso de variantes  
degeneradas ou seus fragmentos. Conforme aqui definido, uma  
10 "variante degenerada" é um polinucleotídeo que difira da  
sequência de nucleotídeos (e seus fragmentos) devido a uma  
degeneração do código genético, mas que ainda codifique a  
mesma proteína.

O ácido nucléico pode compreender DNA, DNA  
15 cromossômico, cDNA e RNA e também podem compreender  
nucleotídeos heterólogos. De acordo com várias modalidades,  
o ácido nucléico se hibridiza com um certo ácido nucléico,  
seu complemento, sua variante degenerada ou seu fragmento,  
sob condições de hibridização de alto rigor. Em ainda outras  
20 modalidades, o polinucleotídeo se hibridiza sob condições de  
hibridização de rigor intermediário.

Deve-se perceber que os ácidos nucléicos podem ser  
obtidos de fontes naturais, sintéticas ou semi-sintéticas;  
além disso, a sequência de nucleotídeos pode ser uma  
25 sequência de ocorrência natural ou pode estar relacionada  
por mutação, incluindo substituições, deleções, inserções e  
inversões de bases únicas ou múltiplas, com essa sequência  
de ocorrência natural. A molécula de ácido nucléico pode ser

RNA, DNA, de fita simples ou fita dupla, linear ou de forma circular covalentemente fechada.

Exemplos de condições de rigor são mostradas na Tabela de Condições de Rigor abaixo: condições altamente rigorosas são aquelas que são pelo menos tão rigorosas quanto, por exemplo, as condições A - F; condições rigorosas são pelo menos tão rigorosas quanto, por exemplo, as condições G - L; e condições de reduzido rigor são pelo menos tão rigorosas quanto, por exemplo, as condições M - R.

10

CONDIÇÕES DE RIGOR

Condição de Rigor	Híbrido Polinucleotídico	Comprimento do Híbrido (pb) <sup>I</sup>	Temperatura de Hibridização e Tampão <sup>H</sup>	Temperatura de Lavagem e Tampão <sup>H</sup>
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1xSSC -ou- 42EC; 1xSSC, 50% formamida	65EC; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T <sub>B</sub> ; 1xSSC	T <sub>B</sub> ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1xSSC -ou- 45EC; 1xSSC, 50% formamida	67EC; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T <sub>D</sub> ; 1xSSC	T <sub>D</sub> ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1xSSC -ou- 50EC; 1xSSC, 50% formamida	70EC; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T <sub>F</sub> ; 1xSSC	T <sub>F</sub> ; 1xSSC

G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4xSSC -ou- 42EC; 4xSSC, 50% formamida	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T <sub>H</sub> ; 4xSSC	T <sub>H</sub> ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4xSSC -ou- 45EC; 4xSSC, 50% formamida	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T <sub>J</sub> ; 4xSSC	T <sub>J</sub> ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4xSSC -ou- 50EC; 4xSSC, 50% formamida	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T <sub>L</sub> ; 2xSSC	T <sub>L</sub> ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4xSSC -ou- 40EC; 6xSSC, 50% formamida	50EC; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T <sub>N</sub> ; 6xSSC	T <sub>N</sub> ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4xSSC -ou- 42EC; 6xSSC, 50% formamida	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T <sub>P</sub> ; 6xSSC	T <sub>P</sub> ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4xSSC -ou- 45EC; 6xSSC, 50% formamida	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T <sub>R</sub> ; 4xSSC	T <sub>R</sub> ; 4xSSC

pb<sup>I</sup>: O comprimento do híbrido é aquele antecipado para a(s) região(ões) hibridizada(s) dos polinucleotídeos de hibridização. Quando se hibridiza um polinucleotídeo a um

polinucleotídeo alvo de sequência desconhecida, o comprimento do híbrido é considerado o do polinucleotídeo de hibridização. Quando se hibridizam polinucleotídeos de sequência conhecida, o comprimento do híbrido pode ser determinado por alinhamento das sequências dos polinucleotídeos e identificação da região ou regiões de complementaridades ótimas de sequência.

Tampão<sup>H</sup>: SSPE (1xSSPE é 0,15M de NaCl, 10mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 1,25mM de EDTA, pH 7,4) pode substituir SSC (1xSSC é 0,15M de NaCl e 15mM de citrato de sódio) nos tampões de hibridização e lavagem; as lavagens são realizadas durante 15 minutos depois de completa a hibridização.

T<sub>B</sub> a T<sub>R</sub>: A temperatura de hibridização para híbridos antecipados como sendo menores que 50 pares de bases de comprimento deve ser de 5 - 10°C abaixo da temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) do híbrido, em que T<sub>m</sub> é determinada de acordo com as seguintes equações. Para híbridos com menos de 18 pares de bases de comprimento, T<sub>m</sub>(EC) = 2(nº de bases A + T) + 4(nº de bases G + C). Para híbridos entre 18 e 49 pares de bases de comprimento, T<sub>m</sub>(EC) = 81,5 + 16,6(log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0,41(%G+C) - (600/N), em que N é o número de bases no híbrido, e [Na<sup>+</sup>] é a concentração de íons sódio no tampão de hibridização ([Na<sup>+</sup>] para 1xSSC = 0,165 M).

Exemplos adicionais de condições de rigor para hibridização de polinucleotídeos são apresentados em Sambrook, J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 e 11, e Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., seções 2.10 e 6.3-6.4, aqui  
5 incorporados por referência.

A invenção considera o uso de polinucleotídeos que sejam completamente complementares a esses polinucleotídeos, assim como sequências antissentido. As sequências antissentido, também chamadas de oligonucleotídeos  
10 antissentido, incluem tanto sequências geradas internamente, quanto administradas externamente, que bloqueiem a expressão de polinucleotídeos que codifiquem os polipeptídios da invenção. As sequências antissentido da invenção compreendem, por exemplo, cerca de 15 - 20 pares de bases,  
15 sem limitação. As sequências antissentido podem ser projetadas, por exemplo, para inibir a transcrição mediante prevenção da ligação do promotor a uma sequência não traduzida a montante ou prevenção da tradução de um transcrito que codifique um polipeptídio da invenção ao  
20 evitar a ligação do ribossomo.

Os polinucleotídeos podem ser preparados ou obtidos de qualquer maneira adequada (por exemplo, por síntese química, a partir de bibliotecas de DNA, a partir do próprio organismo) e podem ter várias formas (como fita  
25 simples, fita dupla, vetores, sondas, primers), conforme seria entendido por aqueles versados na técnica. O termo "polinucleotídeo" inclui DNA e RNA, e também seus análogos, como aqueles contendo estruturas principais modificadas. De

acordo com implementações adicionais da presente invenção, os polinucleotídeos compreendem uma biblioteca de DNA, como uma biblioteca de cDNA.

Sistemas de Expressão da Proteína 2086:

5           Apresenta-se um microorganismo recombinante capaz  
de expressar o polipeptídeo 2086 de *Neisseria meningitidis*  
sorogrupo B 2086 de acordo com uma modalidade da presente  
invenção. O microorganismo recombinante compreende uma  
sequência de controle de expressão com sequências promotoras  
e sequências iniciadoras, e uma sequência de nucleotídeos  
10           que codifica um polipeptídeo 2086, a sequência de  
nucleotídeos estando localizada em 3' com relação às  
sequências promotoras e iniciadoras. Em um aspecto  
adicional, apresenta-se uma célula hospedeira compreendendo  
15           um polinucleotídeo 2086 recombinante, conforme aqui descrito  
e nos WO 03/063766 e WO 04/094596, que são aqui incorporados  
por referência em sua inteireza. Assim, a presente invenção  
apresenta um método para a produção de uma proteína 2086  
recombinante, conforme descrito nos WO 03/063766 e WO  
20           04/094596, por exemplo, sem limitação.

          Uma vez que as células hospedeiras que expressam a  
proteína ou polipeptídeo desejado da invenção tenham sido  
construídas por transformação, transfecção ou infecção de  
células hospedeiras com plasmídios contendo o  
25           polinucleotídeo 2086 correspondente, as células hospedeiras  
são cultivadas sob condições em que os polipeptídios sejam  
expressos de acordo com os métodos da presente invenção. O  
polipeptídeo pode ser, então, isolado substancialmente livre

de componentes contaminantes da célula hospedeira por técnicas bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

Parâmetros de Limiar:

Vários parâmetros de limiar podem ser usados para monitorizar e controlar o progresso da cultura em termos de crescimento celular e expressão de proteína recombinante. Esses parâmetros incluem, mas não se limitam a, densidade óptica (OD), oxigênio dissolvido (DO), pH, consumo de nutriente/energia (como fonte de carbono), acúmulo de subprodutos metabólicos (por exemplo, ácido acético), tempo de colheita e temperatura. Qualquer parâmetro adequado ou combinação de parâmetros é considerada para uso na presente invenção, conforme seria compreendido por aqueles versados na técnica, com base nas orientações aqui apresentadas.

Estabelece-se um parâmetro de limiar para determinar o ponto em que o indutor deve ser continuamente adicionado à cultura (isto é, alimentado à cultura com o tempo). O parâmetro de limiar é um parâmetro predeterminado. Um parâmetro de limiar apropriado, como uma densidade óptica predeterminada, é prontamente determinado por alguém versado na técnica com base nas orientações aqui apresentadas, de acordo com várias modalidades da presente invenção. Pode-se usar um parâmetro de limiar ou uma combinação de parâmetros de limiar.

O parâmetro ou combinação de parâmetros pode ser monitorizada em quaisquer intervalos de tempo adequados na cultura. Por exemplo,  $OD_{600}$  e concentrações de glicose podem

ser monitorizados a intervalos de uma hora, meia hora ou um quarto de hora, sem limitação.

A densidade óptica é usada como o parâmetro de limiar para início da alimentação contínua de indutor, de acordo com uma modalidade da presente invenção. Quando a densidade celular da cultura atinge um parâmetro de limiar predeterminado, como uma densidade óptica de cerca de 70 a cerca de 110, o indutor é, então, alimentado à cultura, conforme aqui descrito. Pode-se estabelecer uma faixa mais estreita para o parâmetro de limiar. Por exemplo, a presente invenção considera que se pode iniciar a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma densidade óptica de cerca de 70 a cerca de 105, de cerca de 75 a cerca de 100, de cerca de 75 a cerca de 95, de cerca de 75 a cerca de 85, de cerca de 76 a cerca de 84, de cerca de 78 a cerca de 82 ou de cerca de 80, de acordo com modalidades da presente invenção.

A presente invenção também considera o uso de parâmetros de limiar para sinalizar o início e/ou término da alimentação da fonte de carbono.

Qualquer dispositivo adequado ou combinação de dispositivos é considerada para uso na monitorização do(s) parâmetro(s) de limiar, conforme seria sabido por aqueles versados na técnica. Por exemplo, uma sonda ou uma combinação de sondas para medir um parâmetro de limiar pode ser montada no dispositivo de fermentação (o "fermentador") de qualquer maneira adequada, sem limitação.

Taxas de Alimentação Constante:

As taxas de alimentação constante se referem à taxa em que o(s) indutor(es) e/ou fonte(s) de carbono é(são) adicionado(s) à cultura. O indutor é adicionado à cultura após um parâmetro de limiar ter sido atingido. A fonte de carbono também pode ser adicionada à cultura após um parâmetro de limiar ser atingido (e, da mesma forma, a adição da fonte de carbono pode ser terminada ao se atingir um parâmetro de limiar). Esses parâmetros de limiar incluem, sem limitação, densidade óptica (OD), oxigênio dissolvido (DO), pH, concentração de nutriente no meio de cultura, concentração total da primeira fonte de carbono adicionada ao meio de cultura ou qualquer combinação desses.

Qualquer taxa constante adequada é usada para adicionar continuamente o indutor e/ou fonte de carbono à cultura, conforme seria compreendido por aqueles versados na técnica com base nas orientações aqui apresentadas. De acordo com várias modalidades da presente invenção, uma taxa constante adequada é determinada por DO-stat, conforme descrito nos exemplos abaixo. Por exemplo, uma taxa de alimentação equivalente ao controlador DO-stat pode ser selecionada por adição de glicose suficiente para levar a concentração a 15 e 24 g/L a cada hora, sem limitação.

Por exemplo, o indutor e/ou fonte de carbono pode ser adicionado à cultura a uma taxa constante até que uma certa quantidade de indutor e/ou fonte de carbono, como de cerca de 4 g/L a cerca de 40 g/L, como 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 9.5 g/L, 9.75 g/L, 10 g/L, 10.25 g/L, 10.5 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, 14 g/L, 15 g/L, 16 g/L, 17

g/L, 18 g/L, 19 g/L, 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, 25 g/L, 26 g/L, 27 g/L, 28 g/L, 29 g/L, 30 g/L, 31 g/L, 32 g/L, 33 g/L, 34 g/L, 35 g/L, 36 g/L, 37 g/L, 38 g/L, 39 g/L, 40 g/L, com base no volume total da cultura, tenha sido adicionada à cultura, sem limitação. De acordo com várias modalidades, a quantidade total de indutor e/ou fonte de carbono alimentada à cultura é de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L, 7 g/L a cerca de 15 g/L, 8 g/L a cerca de 14 g/L, 9 g/L a cerca de 11 g/L, ou cerca de 10 g/L.

10                   A quantidade total de indutor a ser adicionada à cultura pode ser compensada pela quantidade total de fonte de carbono adicionada à cultura. Por exemplo, quando a fonte de carbono é glicose, e o indutor é arabinose, a quantidade de indutor adicionada pode ser reduzida pela adição de glicose. Por exemplo, em uma modalidade, um total de 10 g/L de um indutor (isto é, como arabinose) é adicionado a uma cultura, e 11 g/L de uma fonte de carbono, como glicose, são adicionados. O rendimento de proteína obtido dessa maneira se aproxima do rendimento quando se usa uma quantidade total de 20 g/L de arabinose (isto é, 20.000 g ou 20 kg no total em uma cultura de 1.000 L de arabinose) e nenhuma glicose. Assim, essa compensação proporcionada pelos presentes métodos é vantajosa, dado o alto custo da arabinose com relação à glicose.

25                   De acordo com várias modalidades da invenção, a taxa constante em que o indutor e/ou fonte de carbono é adicionado à cultura pode ser estabelecida na faixa de cerca de 1,5 g/L a cerca de 24 g/L a cada hora. Por exemplo,

quando a fonte de carbono é glicose, a taxa constante para a adição de glicose pode incluir, sem limitação, 1,8 g de glicose/L/h, 3,3 g de glicose/L/h, 6,7 g de glicose/L/h, 15 g de glicose/L/h, 16,4 g de glicose/L/h, 18 g de glicose/L/h, 24 g de glicose/L/h, e outras. De acordo com várias modalidades, um indutor como arabinose é adicionado a taxas constantes de cerca de 1,5 g/L/h a cerca de 16 g/L/h.

De acordo com várias modalidades, uma vez que um parâmetro de limiar tenha sido atingido, a alimentação de fonte de carbono pode ser continuada, parada ou temporariamente interrompida. A alimentação da fonte de carbono pode ser interrompida, caso em que a alimentação será reiniciada à taxa constante uma vez que o limiar para início da alimentação tenha sido atingido. Assim, de acordo com uma modalidade, podem-se usar um limiar de início e um limiar de parada para regular a alimentação da fonte de carbono à cultura. De acordo com outra modalidade, tanto glicose, quanto arabinose são alimentadas a uma taxa constante com base no parâmetro de limiar, sem parar ou reiniciar a alimentação.

A quantidade total apropriada de fonte de carbono a ser adicionada a qualquer cultura específica pode ser prontamente determinada por aqueles versados na técnica com base nas orientações aqui apresentadas. A quantidade total de fonte de carbono adicionada à cultura pode variar de cerca de 1 g/L a cerca de 100 g/L (com base no volume total em litros da cultura) de acordo com uma modalidade da presente invenção. Por exemplo, de acordo com uma

modalidade, 50 g/L de glicose são adicionados durante a fase de crescimento partindo-se de 10 g/L no meio, começando a alimentação de glicose a taxa constante quando o nível de glicose atinge zero e continuando a alimentação de glicose a taxa constante até que a OD atinja 80, quando, então, cerca de 40 g/L de glicose terão sido alimentados, além dos 10 g/L de glicose iniciais. De acordo com uma modalidade, as quantidades totais de fonte de carbono são fornecidas em forma concentrada para facilitar o escalonamento. Essas quantidades são prontamente convertidas na massa total da fonte de carbono a ser usada em uma circunstância particular. Por exemplo, quando 10 g/L de fonte de carbono devem ser adicionados a uma cultura de 1.000 L, a quantidade total de fonte de carbono a ser adicionada é prontamente determinada como  $10 \text{ g/L} \times 1.000 \text{ L} = 10.000 \text{ gramas}$  (ou 10 kg) de fonte de carbono total. A quantidade total de fonte de carbono adicionada pode servir de parâmetro de limiar de acordo com várias modalidades conforme aqui descritas.

A quantidade total apropriada de indutor a ser adicionada a qualquer cultura específica pode ser prontamente determinada por aqueles versados na técnica com base nas orientações aqui apresentadas. A quantidade total de indutor adicionada à cultura pode variar de cerca de 4 g/L a cerca de 40 g/L (com base no volume total em litros da cultura) de acordo com várias modalidades. De acordo com várias modalidades, a quantidade total de fonte de carbono adicionada à cultura é de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L, 7 g/L a cerca de 15 g/L, 8 g/L a cerca de 14 g/L, 9 g/L a

cerca de 11 g/L, ou cerca de 10 g/L com base no volume total da cultura. De acordo com uma modalidade, as quantidades totais de indutor são fornecidas em forma concentrada para facilitar o escalonamento. Essas quantidades são prontamente

5 convertidas na massa total do indutor a ser usado em uma circunstância particular. Por exemplo, quando 10 g/L de indutor devem ser adicionados a uma cultura de 1.000 L, a quantidade total de indutor a ser adicionada é prontamente

10 determinada como  $10 \text{ g/L} \times 1.000 \text{ L} = 10.000 \text{ gramas}$  (ou 10 kg) de indutor total.

O meio de cultura fresco tipicamente contém uma quantidade inicial de uma primeira fonte de carbono no momento da inoculação com uma célula hospedeira, criando, assim, uma cultura. Essa concentração inicial pode ser

15 monitorizada, e a concentração da primeira fonte de carbono usada como um parâmetro de limiar.

Qualquer suplemento ou nutriente adequado, além da fonte de carbono, também pode ser alimentado à cultura em quantidades apropriadas. O outro nutriente ou suplemento

20 pode ser monitorizado, e limiares apropriadamente estabelecidos. Suplementos como nitrogênio ou fontes de fosfato inorgânico são considerados para uso na presente invenção. Exemplos não limitativos de compostos que são considerados para uso nos métodos da presente invenção

25 incluem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , citrato de sódio, diidrato,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ , cloranfenicol ou qualquer combinação desses. O uso de uma fonte ou fontes de carbono adicionais também é considerado.

Densidade Óptica e Fase de Crescimento Logarítmico:

A introdução de uma célula hospedeira bacteriana a meios de cultura frescos cria uma cultura que tipicamente atravessa quatro fases de crescimento mais ou menos distintas: (i) fase de retardo, (ii) fase log (logarítmica ou exponencial), (iii) fase estacionária, e (iv) fase de declínio (morte). A própria fase log pode ser adicionalmente dividida em várias fases, como fase de crescimento logarítmico inicial, fase de crescimento logarítmico média e fase de crescimento logarítmico tardia. A densidade óptica está relacionada à fase de crescimento logarítmico. A fase de crescimento logarítmico e a densidade óptica também podem ser usadas como parâmetros de limiar para sinalizar o início e/ou parada da alimentação constante da fonte de carbono e/ou indutor.

Por exemplo, a indução ou adição contínua do indutor pode começar na fase de crescimento logarítmico inicial, fase de crescimento logarítmico média e fase de crescimento logarítmico tardia. A fase de crescimento logarítmico tardia pode ocorrer a uma OD de cerca de 70 a cerca de 110. Em uma modalidade da invenção, a alimentação a taxa constante do indutor começará na fase de crescimento logarítmico tardia do meio de cultura ou a uma OD de cerca de 70 a cerca de 110, de cerca de 70 a cerca de 105, de cerca de 75 a cerca de 85, ou cerca de 80 de acordo com várias modalidades.

A OD pode ser medida a vários comprimentos de onda que sejam comumente empregados por aqueles versados na

técnica. Tipicamente, usa-se a  $OD_{600}$  como uma medida do crescimento celular e densidade de células na cultura. A menos que indicado de outra forma, "OD", conforme aqui usado, refere-se a  $OD_{600}$ .

5

Oxigênio Dissolvido:

Outro parâmetro que pode servir de gatilho para o início e/ou parada do controlador de alimentação é o oxigênio dissolvido (DO) (isto é, fermentação por batelada alimentada DO-stat). O DO pode ser controlado ajustando-se a agitação, fluxo de ar, suplemento de oxigênio e pressão no recipiente para controlar os meios de cultura. O limiar de DO pode ser estabelecido na faixa de 5% a 80% de DO, como 20%, 40%, ou 80%. Uma vez que o limiar tenha sido encontrado, o controlador de alimentação para a fonte de carbono ou indutor pode ser ligado até ser atingido um limiar que sinalize a parada da alimentação de controle. O limiar de parada pode ser outro limiar de DO ou outro parâmetro, como a quantidade da fonte de carbono ou indutor. Por exemplo, sempre que o DO se elevar acima de 30% ou 40% em um meio de cultura, o controlador de alimentação pode ser iniciado até o momento em que o DO caia para 20%, ou, alternativamente, até que 0,5 g/L ou 1 g/L da fonte de carbono ou indutor tenha sido recém adicionado de acordo com várias modalidades da presente invenção.

25

pH:

Outro parâmetro que pode servir de gatilho para o início e/ou parada do controlador de alimentação é o pH (isto é, fermentação por batelada alimentada pH-stat). O pH

pode ser controlado pela adição de base ou ácido aos meios de cultura. O limiar de pH pode ser estabelecido na faixa de 6,8 a 7,2, como 7,0. Uma vez que o limiar tenha sido encontrado, o controlador de alimentação para a fonte de carbono ou indutor pode ser ligado até que se atinja um limiar que sinalize a parada da alimentação de controle. O limiar de parada pode ser outro limiar de pH ou outro parâmetro, como a quantidade da fonte de carbono ou indutor. Por exemplo, sempre que o pH se elevar a 6,97 em um meio de cultura, o controlador de alimentação pode ser iniciado até o momento em que o pH caia para 6,95, ou, alternativamente, até que 1 g/L da fonte de carbono ou indutor tenha sido recém adicionada de acordo com várias modalidades da presente invenção.

15

#### Tempo de Colheita:

O tempo de colheita representa a quantidade de tempo que se passa depois da indução inicial ou adição de um indutor. Qualquer tempo de colheita adequado é considerado pela presente invenção. O tempo de colheita pode variar de cerca de 2 horas a cerca de 10 horas, de cerca de 2 horas a cerca de 8 horas, de cerca de 2,5 horas a cerca de 7 horas, de cerca de 3 horas a cerca de 6 horas, e outras, de acordo com várias modalidades da presente invenção. Usando-se a taxa de alimentação constante, o tempo de colheita e a quantidade total de indutor, aqueles versados na técnica perceberão como cada parâmetro pode ser ajustado para se conseguirem os resultados desejados. Aqueles versados na técnica entenderão quando colher com base na quantidade de

arabinose alimentada, porque poderiam prontamente determinar a quantidade alimentada com base na taxa de alimentação e no período de tempo. Dessa maneira, concentrações finais do indutor de 5, 10, 20, 30, e 40 g/L alimentadas em 3 horas  
5 podem ser conseguidas, por exemplo, sem limitação.

#### Concentração do Indutor:

Um indutor em qualquer concentração adequada é considerado pela presente invenção. As concentrações de indutor utilizáveis para induzir células hospedeiras podem  
10 variar de cerca de 0,00001% a cerca de 20% (v/v), sem limitações.

#### Temperatura:

A cultura das presentes modalidades pode ser incubada a qualquer temperatura que permita o crescimento  
15 das células. Várias temperaturas para incubar a cultura associadas a um crescimento abundante incluem, sem limitação, 22°C, 28°C, 37°C, ou qualquer de suas combinações.

#### Dispositivo de fermentação:

20 Qualquer dispositivo de fermentação adequado (isto é, "fermentador") é considerado para uso na presente invenção, conforme sabido por aqueles versados na técnica. Por exemplo, o fermentador pode conter qualquer número de propulsores (como propulsores Rushton), entradas e/ou sondas  
25 de medição. De acordo com uma modalidade, o fermentador é configurado para incluir três propulsores Rushton e um borrifador de anel ou tubo para introdução de ar no fermentador. A presente invenção considera o uso de sistemas

manual e/ou à base de computador. Assim, o sistema de fermentação pode fazer uma interface com um sistema computadorizado para monitorizar e controlar as fermentações. Dessa maneira, o sistema pode ser completa ou  
5 parcialmente automatizado, de acordo com modalidades da presente invenção.

Composições da Presente Invenção:

Composições compreendendo proteínas recombinantes, como aquelas preparadas de acordo com os métodos da presente  
10 invenção são aqui apresentadas, de acordo com modalidades da presente invenção. As composições da presente invenção compreendem proteína recombinante em alta densidade em uma cultura, como as proteínas recombinantes preparadas de acordo com os métodos da presente invenção, sem que se  
15 pretenda ficar limitado a esses.

A composição compreende uma cultura com proteína recombinante a uma densidade de pelo menos cerca de 1,5 g/L com base no volume total da cultura. A densidade da proteína recombinante é de pelo menos cerca de 1,7 g/L com  
20 base no volume total da cultura de acordo com uma modalidade adicional da presente invenção. A densidade da proteína recombinante é de pelo menos cerca de 2,0 g/L com base no volume total da cultura de acordo com outra modalidade da presente invenção. A densidade da proteína recombinante é de  
25 pelo menos cerca de 3,0 g/L com base no volume total da cultura de acordo com outra modalidade da presente invenção.

Apresenta-se uma composição compreendendo proteína 2086 recombinante em uma modalidade da presente invenção. A

proteína 2086, conforme aqui mencionada, é uma proteína expressada por um polinucleotídeo que corresponde ao gene 2086 em *N. meningitidis* sorogrupo B, incluindo qualquer fragmento, derivado ou mutação dela. Proteínas 2086 exemplificativas não limitativas são descritas nos WO 03/063766 e WO 04/094596.

A composição de proteína 2086 recombinante compreende proteína 2086 recombinante em uma cultura em que a proteína 2086 recombinante esteja a uma densidade de pelo menos cerca de 1,5 g/L com base no volume total da cultura. A densidade da proteína 2086 recombinante é de pelo menos cerca de 1,7 g/L com base no volume total da cultura de acordo com uma modalidade adicional da presente invenção. A densidade da proteína 2086 recombinante é de pelo menos cerca de 2,0 g/L com base no volume total da cultura de acordo com outra modalidade da presente invenção. A densidade da proteína 2086 recombinante é de pelo menos cerca de 3,0 g/L com base no volume total da cultura de acordo com outra modalidade da presente invenção.

As composições da presente invenção podem compreender qualquer proteína, como uma proteína preparada de acordo com um método da presente invenção. As proteínas recombinantes podem ser proteínas lipidadas ou não lipidadas. Em uma modalidade da invenção, a proteína recombinante é proteína 2086 recombinante lipitada ou não lipitada. A proteína 2086 recombinante pode ser uma proteína 2086 da subfamília A ou subfamília B, ou uma combinação delas. As composições da presente invenção podem incluir uma

proteína ou mais de uma proteína. As proteínas podem ser proteínas relacionadas ou não relacionadas. Por exemplo, uma composição da presente invenção pode incluir proteína 2086 correspondendo a uma ou mais cepas da subfamília A e/ou uma  
5 ou mais cepas da subfamília B.

Composições compreendendo material para uso na condução dos métodos da presente invenção também são aqui apresentadas. Essas composições incluem os componentes necessários para a cultura, incluindo células recombinantes e nutrientes, de acordo com modalidades da presente  
10 invenção. As várias composições podem ser fornecidas juntas em um kit, de acordo com uma modalidade da presente invenção. Por exemplo, os componentes para formar a cultura podem ser convenientemente pré-embalados nas quantidades  
15 requeridas para facilitar o uso em ambientes laboratoriais ou industriais, sem limitação. Esse kit também pode incluir etiquetas, indicadores e orientações para facilitar o uso de cada componente e a maneira de combinar os componentes de acordo com várias modalidades da presente invenção.

Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar várias modalidades da invenção. Aqueles versados na técnica devem perceber que as técnicas apresentadas nos exemplos a seguir representam técnicas descobertas pelos inventores que funcionam bem na prática da invenção, e, portanto, podem ser  
20 consideradas como constituindo vários modos para sua prática. Entretanto, aqueles versados na técnica devem, em vista da presente exposição, perceber que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são

apresentadas e ainda obter um resultado igual ou similar, sem sair do espírito e âmbito da invenção.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1: Fermentação por batelada alimentada com taxa de 5 alimentação constante

Usou-se E. coli (pPW62) subfamília B como uma cepa modelo para um processo de fermentação por batelada alimentada. Com base nos resultados, o processo será aplicado à subfamília A de E. coli (pPW102).

10 Prepararam-se um meio e uma solução de alimentação para a fermentação por batelada alimentada usando-se os componentes relacionados nas tabelas a seguir.

##### Meio e solução de alimentação:

Tabela 1: Meio Basal

Componente	Quantidade por litro
Dextrose, Anidra	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
Citrato de sódio, Diidrato	1 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1 g
(Na) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,58 g
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,075 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,09 g
1000x Solução de estoque de metais residuais (Tabela 6)	1 mL
Cloranfenicol	15 mg

Tabela 2: 1000x Solução de estoque de metais residuais

Componente	Quantidade por litro
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	30 g
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	9 g
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	4,2 g
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,6 g
Ácido molibbdico, Sal de amônio, Tetraidrato	1,5 g

Tabela 3: Solução de alimentação concentrada de glicose

Componente	Quantidade por litro
Glicose	500/700 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g

Tabela 4: Solução de alimentação concentrada de arabinose

Componente	Quantidade por litro
Arabinose	250/500 g e variável com base no experimento
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g

Métodos:

A fermentação por batelada alimentada com taxa de alimentação constante foi usada para se conseguir uma alta densidade celular na fermentação com E. coli. A concentração inicial de glicose era de 10g/L no meio. A concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi aumentada para 3 g/L no meio de fermentação, mas mantida em 1 g/L no meio de cultura de semente. Para se determinar a taxa de alimentação, realizou-se primeiro uma batelada alimentada DO-stat. O nível de DO foi controlado em 20% por um controlador em cascata, que aumentava a velocidade de agitação ao máximo e, então, usava suplementação com oxigênio. Quando a glicose foi depletada, o DO subiu acentuadamente (acima de 40%) e o concentrado de glicose foi adicionado a uma concentração final de 1 g/L no fermentador. Após cada adição de glicose, a bomba permanecia desligada durante um tempo estabelecido, antes de se permitir a adição seguinte. A OD de cerca de 160 foi atingida quando se realizou uma fermentação por batelada alimentada DO-stat. A taxa constante foi, então, escolhida como sendo equivalente ao controlador DO-stat adicionando glicose suficiente para levar a concentração a 18 g/L ou 24 g/L a cada hora. Durante a fermentação por batelada alimentada com taxa de alimentação constante, a alimentação de glicose era ligada à taxa constante desejada quando havia uma elevação acentuada a 40% no DO.

As culturas de semente foram iniciadas usando-se um frasco de E. coli (pPW62) por litro de meio basal + 15  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol em um balão Fernbach de 2.800 mL. Os

balões foram incubados a 32°C, 150 rpm durante uma noite (~16 h). A OD<sub>600</sub> final era normalmente de ~ 3. Usou-se um tamanho de inóculo de 10% para inocular cada fermentador. Cada fermentador usou 3 propulsores Rushton e um borrifador de anel. Ajustes iniciais: temp: 36°C, pH: 7,00 ± 0,05 (controlado com NH<sub>4</sub>OH a 7,4 N), fluxo de ar: ~1 vvm, DO: 20%. O DO foi controlado por uma cascata de agitação (min: 150 rpm, max: 1.000 rpm) e adição de O<sub>2</sub> mediante uma unidade de mistura de gás. Controlou-se a espuma, caso necessário, por adição manual de PPG-2000. 0,35 mL/L de AF foram adicionados ao meio antes da esterilização. Durante a fermentação, colheram-se amostras a cada hora para monitorizar a glicose, pH, e OD<sub>600</sub> off-line. Os sobrenadantes foram preparados a partir de amostras de 1 mL e armazenados para análise posterior de ácidos orgânicos por HPLC.

#### Resultados:

Fermentação por batelada alimentada com taxa de alimentação constante:

A Figura 1 mostra os cursos temporais de OD, consumo de glicose e acúmulo de ácido acético com taxas de alimentação constantes. ODS máximas de 158 e 150 foram obtidas com taxas de alimentação constantes de 24 g de glicose/L/h e 18 g de glicose/L/h, respectivamente. Uma elevada glicose de 28 g/L foi acumulada durante a operação, quando se usou uma taxa de alimentação de 24 g/L/h. A glicose se acumula a 12 g/L quando se usa uma taxa de alimentação de 18 g/L/h. Pouco ácido acético (isto é, menos de 1,5 g/L) foi produzido em ambos os casos. A fase de

crescimento exponencial termino perto de OD 100. A taxa de crescimento específica foi de aproximadamente 0,60 ( $\text{hr}^{-1}$ ) em ambos os casos.

Para reduzir o acúmulo de glicose, foram  
5 examinadas baixas taxas de alimentação constantes de 16,4  
g/L/h e 15 g/L/h. A Figura 2 mostra os cursos temporais de  
OD, consumo de glicose e acúmulo de ácido acético com as  
taxas de alimentação constantes acima mencionadas. As ODs  
máximas foram de 142 e 147, respectivamente. Como em  
10 operações anteriores, a cultura com a taxa de alimentação  
mais rápida acumulou mais glicose, embora a quantidade de  
glicose se acumulasse muito menos que nos experimentos  
anteriores. Cerca de 8 g/L de glicose foram acumulados  
durante a fermentação a 16,4 g/L/h, e 5,4 g/L de glicose  
15 durante a fermentação a 15 g/L/h. Pouco ácido acético (como  
menos de 1,5 g/L) foi produzido em ambos os casos (veja a  
Figura 2). A taxa de crescimento específica foi de  
aproximadamente 0,60 ( $\text{hr}^{-1}$ ) em ambos os casos. Assim, a taxa  
de crescimento específica não foi afetada pela taxa de  
20 alimentação entre 15 g/L/h e 24 g/L/h.

#### Indução a várias ODs de crescimento:

Usou-se uma taxa de alimentação constante de 15 g  
de glicose/L/h para o estudo de indução com arabinose,  
porque resultava em alta densidade celular e baixo acúmulo  
25 de glicose e ácido acético. Neste experimento, foram  
comparadas induções na fase de crescimento logarítmico média  
OD ~55 e na fase de crescimento logarítmico tardia OD ~80. A  
cultura foi induzida simplesmente substituindo-se a

alimentação de glicose pela alimentação de arabinose e alimentando-se a arabinose a uma taxa constante de 13,4 g/L/h. Um total de 40 g/L de arabinose foi adicionado a cada cultura no decorrer de 3 horas. Após a indução, colheram-se amostras a cada hora para o ensaio de rLP2086 por SDS-PAGE, ensaios de ácido orgânico e arabinose por HPLC.

A Figura 3 mostra os cursos temporais de OD e produção de rLP2086 quando induzidos a ODs ~55 e ~80. Tanto a OD máxima, quanto o rendimento de rLP2086 foram maiores quando as células foram induzidas a OD ~80 (OD máxima: 101 versus 84; rendimento máximo: 1,8 g/L versus 1,2 g/L).

#### Indução com vários níveis de arabinose:

A finalidade dos experimentos a seguir foi a de avaliar a quantidade total de arabinose alimentada à cultura e examinar se a redução da quantidade total de arabinose alimentada à cultura ainda resultaria em elevada expressão de rLP2086. O concentrado de arabinose foi alimentado a 4 culturas diferentes, cada uma a diferentes taxas de alimentação no decorrer de 3 horas, resultando em concentrações finais de arabinose de 10, 20, 30, e 40 g/L. Todas as culturas foram induzidas a OD<sub>600</sub> ~ 80. A Figura 4 mostra os cursos temporais de OD e produção de rLP2086. A Tabela 5 resume a OD e rendimentos de rLP2086 para cada uma das quatro condições. Mostra os rendimentos máximos de rLP2086 de: 1,2 g/L para os 10 g/L de arabinose total adicionada; 1,6 g/L para os 20 g/L de arabinose total adicionada; 1,7 g/L para os 30 g/L de arabinose total adicionada; 2,0 g/L para os 40 g/L de arabinose total

adicionada. Uma alimentação de arabinose entre 20 g/L e 40 g/L resultou em rendimento de rLP2086 similar, entretanto, 10 g/L de arabinose produziram muito menos rLP2086 (isto é, 1,2 g/L). Esses resultados sugerem que a quantidade total de arabinose adicionada para indução pode ser reduzida de 40 g/L para 20 g/L sem reduzir a produtividade de rLP2086. Assim, a redução no uso de arabinose seria mais eficaz em termos de custo, particularmente considerando-se o alto custo da arabinose (aproximadamente 500 dólares/kg).

Tabela 5: Indução com vários níveis de arabinose

Lote	Arabinose total alimentada (g/L)	rLP2086 máximo (g/L)
X-BRN05-027	10	1,2
X-BRN05-024	20	1,6
X-BRN05-025	30	1,7
X-BRN10-114	40	2,0

10            Comparação dos métodos de adição de arabinose:

O experimento a seguir foi conduzido para examinar se uma estratégia de alimentação contínua é superior a uma simples adição por bateladas, quando aplicada à arabinose para indução. Na operação X-BRN05-039, 20g/L de arabinose foram adicionados ao fermentador de uma única vez, em vez de se alimentar no decorrer do tempo, quando a OD era de cerca de 80. A Figura 5 mostra os cursos temporais de OD, consumo de glicose e arabinose, e produção de rLP2086. Um máximo de

1,3 g/L de rLP2086 foi obtido. A adição por bateladas da arabinose, embora operacionalmente mais simples, produziu menos rLP2086 do que a alimentação contínua. Assim, uma estratégia de alimentação contínua de arabinose é superior à  
5 adição por bateladas simples.

Para examinar se a arabinose pode ser mais eficientemente usada por redução da taxa de alimentação de arabinose, taxas de alimentação de 3,3 g de arabinose/L/h e 6,7 g de arabinose/L/h foram comparadas. A Figura 6 mostra  
10 os cursos temporais de OD e produção de rLP2086. O concentrado de arabinose foi alimentado a uma cultura a uma taxa de alimentação de 6,7 g/L/h no decorrer de 3 horas, e uma segunda cultura foi alimentada a uma taxa de 3,3 g/L/h no decorrer de 6 horas. Para ambas as culturas, a quantidade  
15 total de arabinose adicionada foi de 20 g/L. Conforme mostrado na Figura 6, ambas as condições produziram a mesma quantidade de rLP2086 máximo (isto é, 2,2 g/L), mas houve diferenças na cinética de produção. A taxa de alimentação mais alta resultou em uma taxa de produção mais elevada. O  
20 rLP2086 máximo foi atingido 3 horas e 6 horas após a indução com taxas de alimentação de 6,7 g/L/h e 3,3 g/L/h, respectivamente. A vantagem de se usar uma taxa de alimentação mais elevada (isto é, 6,7 g/L/h) é que o custo de produção (por exemplo, custo de utilidade) será menor  
25 quando se usa uma taxa de alimentação mais elevada do que quando se usa uma taxa de alimentação mais baixa.

Efeito do tempo de indução sobre o rendimento de expressão  
de rLP2086:

Para se determinar o tempo de colheita ótimo, o perfil de alimentação normal (20 g/L de arabinose alimentada durante 3 horas) foi estendido para 40 g/L alimentados durante 6 horas. Nas operações X-BRN05-028 e X-BRN05-029, as células foram induzidas a OD ~55 e OD ~80, respectivamente. A Figura 7 mostra os cursos temporais de OD e produção de rLP2086. Embora a alimentação de arabinose se estendesse de 3 horas para 6 horas, interessantemente, o título de pico ainda foi obtido em torno de 3 horas após a indução. O título de produto era ligeiramente mais elevado na cultura que foi induzida a OD mais elevada. O rendimento máximo de rLP2086 na indução a OD ~55 foi de 2,0 g/L (X-BRN05-028), ao passo que foi de 2,4 g/L na indução a OD ~80 (X-BRN05-029). Esse resultado sugere que as células devem ser colhidas 3 horas após a indução.

#### Comparação de soluções de alimentação com e sem sais:

Para se examinar se sais adicionados são essenciais nas soluções de alimentação de glicose e arabinose, alimentações de glicose e arabinose puras foram comparadas com as alimentações padrões de glicose + sais (isto é,  $K_2HPO_4/KH_2PO_4 + (NH_4)_2SO_4$ ) e arabinose + sais. Para ambas as culturas, 20 g/L de arabinose foram alimentados no decorrer de 3 horas. Os perfis de crescimento e de produção de rLP2086 foram muito similares. O rendimento máximo de rLP2086 foi de 1,8 g/L quando os sais foram adicionados às alimentações, e de 2,0 g/L quando as alimentações de glicose e arabinose foram preparadas sem sais. Esses resultados

sugerem que não há necessidade de adicionar sais às soluções de alimentação de glicose e arabinose.

Fermentação por batelada alimentada com taxa de alimentação constante para a cepa de subfamília B:

5 Culturas de semente foram iniciadas por  
inoculação de 1 L de meio basal contendo 15 µg/mL de  
cloranfenicol com 1 mL de semente de trabalho  
descongelada. A cultura foi cultivada em um balão Fernbach  
de 2,8 L e foi incubada durante cerca de 16 horas a 32°C e  
10 150rpm. A OD<sub>600</sub> final era de ~3,0. 350 mL de culturas de  
semente foram assepticamente transferidas para 3,15 L de  
meio basal contendo 3 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sem cloranfenicol. A  
fermentação foi controlada a pH 7,0 ± 0,05 por NH<sub>4</sub>OH a 7,4  
N, temperatura a 36°C, DO a 20%, e fluxo de ar a lvvm. O DO  
15 foi controlado por uma cascata de agitação (min: 150 rpm,  
max: 1.000 rpm) e adição de oxigênio. Antiespumante PPG-2000  
foi automaticamente adicionado para controlar a espuma.  
Durante a fermentação, colheram-se amostras a cada hora para  
monitorizar a glicose e OD off-line. Após a inoculação, o DO  
20 caiu de ~100% para 20% e, então, foi mantido em 20%. Quando  
houve uma elevação abrupta no DO de 20% para mais de 40%  
(normalmente 6 horas de Tempo de Fermentação Decorrido  
(EFT)), a bomba de alimentação de glicose (sem sais) foi  
ligada a uma taxa de 15 g/L/h. Conforme mostrado na Figura  
25 8, a glicose estava completamente depletada a um EFT de 6  
horas, resultando em uma elevação abrupta no DO. As amostras  
foram colhidas a cada meia hora quando a OD atingiu ~40. A  
alimentação de glicose foi desligada a OD 90, e a

alimentação de arabinose foi ligada a uma taxa de 13,4 g/L/h. Após 3 horas de alimentação de arabinose (sem sais) (isto é, um total de 20g/L de adição de arabinose), a alimentação de arabinose foi desligada, e se deixou a fermentação continuar durante mais uma hora. Conforme mostrado na Figura 8, uma OD de 102 foi obtida, e 2,0 g/L fr MnB rLP2086 foram expressos com base em SDS-PAGE (veja a Figura 9). O pico ocorreu 3 horas após a indução (isto é, um EFT de ~12 horas). SDS-PAGE e Western Blot mostraram que a proteína expressada era, de fato, rLP2086 subfamília B.

Aplicação do processo de fermentação por batelada alimentada para a cepa MnB rLP2086 subfamília A:

Para se testar se o processo de fermentação por batelada alimentada usado para rLP2086 subfamília B era aplicável a rLP2086 subfamília A, o processo foi conduzido usando-se o procedimento estabelecido para a cepa da subfamília B. A Figura 10 mostra os cursos temporais de OD, consumo de glicose e arabinose, e produção de rLP2086. Os perfis de crescimento e produção de rLP2086 para a subfamília A foram similares aos obtidos para a subfamília B (compare com a Figura 8). SDS-PAGE e Western Blot mostraram que a proteína expressada era, de fato, rLP2086 subfamília A (veja a Figura 11). A Tabela 6 relaciona as OD máximas e os rendimentos de expressão de rLP2086 para seis operações diferentes com a subfamília A. A faixa de rendimento de expressão máximo de rLP2086 foi de 1,5 - 2,1 g/L (rendimento máximo médio:  $1,8 \pm 0,2$  g/L), similar aos resultados das fermentações por bateladas alimentadas usadas para produzir

rLP2086 subfamília B. Assim, a fermentação por batelada alimentada desenvolvida para a cepa de subfamília B também é adequada para a cepa de subfamília A.

Tabela 6: Rendimento de expressão e OD máximos de rLP2086 subfamília A

Lote	rLP2086 máximo (g/L)	OD máxima
X-BRN10-118	1,9	104
X-BRN10-119	1,9	104
X-BRN10-120	1,6	100
X-BRN05-042	1,5	100
X-BRN05-043	2,0	77
X-BRN10-121	2,1	92

5 Alimentação dupla de glicose e arabinose durante a indução com arabinose:

Para reduzir a quantidade de arabinose necessária sem reduzir a produção de rLP2086, investigou-se a alimentação dupla de glicose e arabinose durante o período de indução. A estratégia foi alimentar 10 g/L de arabinose durante 3 h (metade da quantidade usual), enquanto se continuava a alimentar glicose durante a fase de indução a 25% (3,75 g/L/h), 50% (7,5 g/L/h), e 100% (15 g/L/h) da taxa de alimentação padrão de glicose. Todas as alimentações, glicose e arabinose, foram preparadas sem aditivos.

As Figuras 12a, 12b, e 12c mostram o curso temporal do crescimento de células da subfamília B, das

concentrações de glicose, arabinose, ácido acético, e da produção de rLP2086. Todas as três operações foram induzidas a OD ~80. Conforme mostrado na Figura 12a, a OD da operação com alimentação de glicose a 100% continuou a subir após a indução, atingindo um pico em 117, ao passo que a operação a 50% atingiu um pico em 106 (Figura 12b), e a operação a 25% manteve-se em torno de 100 (Figura 12c) após a indução. A alimentação de glicose a 100% começou a acumular glicose e arabinose 3 horas após a indução. A operação a 50% de glicose só mostrou uma leve quantidade de glicose na última amostra (leitura = 0,21 g/L). Não houve acúmulo de glicose na operação com 25% de glicose. Nenhuma das três operações acumulou qualquer arabinose. As operações com alimentação a 100% (Figura 12a) e 50% (Figura 12b) de glicose produziram ~1,5 e 1,7 g/L de rLP2086, respectivamente, ao passo que a operação a 25% (Figura 12c) produziu mais de 2,1 g/L. A produção das operações a 100% atingiu um pico antes de acabar a arabinose, sugerindo que a expressão de rLP2086 pode ter sido suprimida pelo acúmulo de glicose e ácido acético. A produção das operações a 50% atingiu um pico aproximadamente ao mesmo tempo em que acabou a arabinose, e a produção das operações a 25% atingiu um pico depois que acabou a arabinose, sugerindo que a expressão de 2086 não podia ser suprimida enquanto a concentração de glicose era controlada em um nível mínimo (nenhuma glicose se acumulou nas Figuras 12b e 12c). Embora apenas 10 g/L de arabinose fossem alimentados a essas culturas, sua produção de rLP2086 era similar à obtida quando se alimentavam 20 g/L.

Alimentações simultâneas de glicose e arabinose podem reduzir o consumo de arabinose em 50% e ainda conseguir o mesmo rendimento de rLP2086, quando a concentração de glicose é controlada em um baixo nível durante a indução.

5 Assim, o custo de substâncias químicas pode ser significativamente reduzido.

Para se examinar se pode reduzir ainda mais o consumo de arabinose e aumentar o rendimento de rLP2086, foram investigadas várias taxas de alimentação de glicose, 10 quantidades totais de arabinose alimentada e ODs de indução. A Tabela 7 relaciona diferentes combinações dessas condições. Parece que uma taxa de alimentação de glicose entre 2,25 e 7,5 g/L/h e uma taxa de alimentação de arabinose entre 1,7 e 6,7 g/L/h não afetariam 15 significativamente o rendimento de rLP2086. ODs de indução entre 80 e 105 resultam em rendimento similar de rLP2086.

Tabela 7: OD e rLP2086 máximos sob diferentes taxas de alimentação de glicose, diferentes quantidades de adição de arabinose, e indução a várias OD

Lote número	Taxa de alimentação de glicose (g/L/h )	Taxa de alimentação de arabinose (g/L/h )	Quantidade de arabinose alimentada	OD de indução	OD máxima	rLP2086 máximo (g/L)
X- BRN10-	3,75	1,7	5 g/L em 3 horas	74	86	1,6

X-	3,75	3,3	20 g/L em	79	122	2,8
BRN05-			3 horas			
056						
X-	3,75	1,7	10.g/L em	94	122	3,0
BRN05-			6 horas			
058						
X-	3,75	6,7	20.g/L em	110	124	2,7
BRN10-			3 horas			
129						
X-	3,75	3,3	20.g/L em	105	126	2,9
BRN05-			6 horas			
059						
X-	5,25	3,3	20.g/L em	102	112	2,6
BRN05-			6 horas			
061						
X-	2,25	3,3	20.g/L em	93	108	2,4
BRN10-			6 horas			
130						

Exemplo 3: Fermentação por batelada alimentada escalonada  
para a escala de 100L

A cultura de sementeira foi iniciada pela inoculação de 2 X 1 L de meio basal contendo 15 µg/mL de cloranfenicol com 1 mL (isto é, 1 frasco) de sementeira de trabalho descongelada. A cultura em Fernbach de 2,8 L foi incubada durante cerca de 16 horas a 32°C e 150rpm em um agitador rotativo.

Duas culturas de semeadura de uma noite em Fernbach de 1 L foram assepticamente transferidas para um fermentador de 150 L contendo 70 L de meio basal sem cloranfenicol. A fermentação de 150L em meio foi controlada a pH  $7,0 \pm 0,05$  por  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 7,4 N, temperatura  $36^\circ\text{C}$ , DO 20%, e fluxo de ar a  $1\text{vvm}$ . O DO foi controlado por uma cascata de agitação e adição de oxigênio. Antiespumante PPG-2000 foi automaticamente adicionado para controlar a espuma. Durante a fermentação, o DO caiu de  $\sim 100\%$  para 20% e foi mantido em 20%. Quando houve uma elevação abrupta no DO de 20% para mais de 40% (normalmente a OD  $\sim 20$ ), sinalizando a depleção de glicose, a bomba de alimentação foi ativada para distribuir concentrado de glicose (isto é, 500 g/L) a uma taxa de 15 g de glicose/L de caldo/h. Durante a fermentação, colheram-se amostras a cada hora para monitorizar a glicose e OD off-line. As amostras foram colhidas a cada meia hora quando a OD atingiu  $\sim 40$ . Uma vez que a OD atingisse  $\sim 80$ , a alimentação de glicose era interrompida, e a alimentação de arabinose era iniciada (por exemplo, 500g/L de concentrado de arabinose) a uma taxa de 6,7 g de arabinose/L de caldo/h durante 3 horas.

A Figura 13a mostra os cursos temporais do crescimento celular da subfamília B, do consumo de glicose, do acúmulo de ácido acético, e da produção de rLP2086 na escala de 100 L. O perfil de fermentação na escala de 100 L foi similar ao observado em pequena escala. Foram obtidos uma OD máxima de 99 e um rendimento máximo de 1,9 g/L de

rLP2086. Esses resultados demonstram que a fermentação por batelada alimentada é escalonável.

A Figura 13b mostra os cursos temporais do crescimento celular da subfamília A, do consumo de glicose, do acúmulo ácido acético, e da produção de rLP2086 na escala de 100 L. O perfil de fermentação a uma escala de 100 L foi similar ao observado em pequena escala. Foram obtidos uma OD máxima de 96 e um rendimento máximo de 2,0 g/L de rLP2086. Esses resultados demonstram que a fermentação por batelada alimentada é escalonável e robusta.

A Figura 14a mostra os cursos temporais da densidade celular da subfamília B, das concentrações de glicose, arabinose, ácido acético, e do rendimento de rLP2086 com alimentação dupla de glicose e arabinose a uma escala de 100 L. Durante a indução, as taxas de alimentação foram controladas em 3,75 e 1,67 g/L/h para alimentação de glicose e arabinose, respectivamente. A dupla arabinose e glicose foi alimentada em 5 horas. Foram obtidos uma OD máxima de 90 e um rendimento máximo de 1,8 g/L de rLP2086. O rendimento máximo de rLP2086 apareceu 4 horas após a indução. A OD máxima média e o rendimento máximo médio de rLP2086 para a subfamília B foram de  $84,8 \pm 6,8$  e  $1,6 \pm 0,3$  g/L, respectivamente. Esses resultados demonstram que a fermentação por batelada alimentada com alimentação dupla de glicose e arabinose durante a fase de indução é escalonável.

A Figura 14b mostra os cursos temporais do crescimento celular da subfamília A, do consumo de glicose, do acúmulo de ácido acético, e da produção de rLP2086 na

escala de 100 L. A fermentação foi operada nas mesmas condições que no parágrafo [0129], e as células foram induzidas durante 6 horas. Foram obtidos uma OD máxima de 89 e um rendimento máximo de 1,8 g/L de rLP2086. O rendimento máximo de rLP2086 apareceu 4 horas após a indução. A OD máxima média é de  $87,9 \pm 10,5$ , e o rendimento máximo médio de rLP2086 é de  $1,8 \pm 0,2$  g/L para a subfamília A. Esses resultados demonstram que a fermentação por batelada alimentada é escalonável e robusta.

10                   Embora a invenção tenha sido descrita com referência a várias modalidades e exemplos, aqueles versados na técnica reconhecerão que se podem fazer várias modificações na invenção sem sair de seu espírito e âmbito.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma proteína recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende:

5 cultivar uma célula bacteriana recombinante para expressar uma proteína recombinante compreendendo a adição contínua de uma fonte de carbono a uma cultura compreendendo a célula bacteriana recombinante e a adição contínua de um indutor à cultura após a cultura atingir um parâmetro de limiar, e o isolamento da proteína recombinante da cultura.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de limiar é a densidade óptica (OD), oxigênio dissolvido (DO), concentração de nutriente no meio de cultura, concentração total da fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, ou  
15 qualquer combinação desses.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de limiar é a densidade óptica (OD) da cultura.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 70 a cerca de 110.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 70 a cerca de 105.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua

do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 75 a cerca de 85.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição do indutor à cultura a uma taxa constante, a adição do indutor à cultura por alimentação DO-stat ou a adição do indutor à cultura por alimentação pH-stat.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição do indutor à cultura a uma taxa constante de cerca de 3,35 g/L/h a cerca de 16 g/L/h, a adição do indutor à cultura por alimentação DO-stat ou por alimentação pH-stat.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total do indutor adicionada à cultura é de cerca de 4 g/L a cerca de 40 g/L.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total do indutor adicionada à cultura durante a alimentação de indutor é de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total do indutor adicionada à cultura durante a alimentação de indutor é de cerca de 7 g/L a cerca de 15 g/L.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total do indutor adicionada à cultura durante a alimentação de indutor é de cerca de 10 g/L.

5 14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura durante cerca de 2 a cerca de 8 horas após o início do método.

10 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura durante cerca de 3 a cerca de 6 horas após o início.

15 16. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende o isolamento da proteína recombinante cerca de 2 a cerca de 8 horas depois de iniciar a adição do indutor à cultura.

20 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que compreende o isolamento da proteína recombinante cerca de 3 a cerca de 6 horas depois de iniciar a adição do indutor à cultura.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é arabinose.

25 19. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da fonte de carbono à cultura antes da indução.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da fonte de carbono à cultura antes e durante a indução.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da fonte de carbono à cultura enquanto o indutor é continuamente adicionado à cultura.

5 22. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da fonte de carbono à cultura até que a densidade celular da cultura atinja uma OD<sub>600</sub> de cerca de 70 a cerca de 110.

10 23. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono é uma fonte de carbono à base de açúcar.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono à base de açúcar é glicose.

15 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é arabinose.

20 26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da glicose ao meio de cultura enquanto a arabinose é continuamente adicionada ao meio de cultura.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da glicose até que a densidade celular da cultura atinja uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

25 28. Método para a produção de uma proteína recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) a introdução em uma célula hospedeira bacteriana de um vetor de expressão que codifique uma

proteína recombinante sob o controle de um promotor induzível para formar uma célula bacteriana recombinante;

b) a introdução da célula bacteriana recombinante em um meio de cultura para formar uma cultura celular;

5 c) a adição de uma fonte de carbono à cultura celular como uma alimentação contínua;

d) a monitorização do crescimento celular na cultura celular quanto a atingir uma densidade óptica de limiar ( $OD_{600}$ );

10 e) a adição de um indutor do promotor induzível à cultura celular como uma alimentação contínua uma vez que a densidade óptica de limiar ( $OD_{600}$ ) seja atingida; e

f) o isolamento da proteína recombinante da cultura celular.

15 29. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma  $OD_{600}$  de cerca de 70 a cerca de 110.

20 30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma  $OD_{600}$  de cerca de 70 a cerca de 105.

25 31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma  $OD_{600}$  de cerca de 75 a cerca de 85.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua

do indutor à cultura quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

33. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é adicionado à cultura a uma taxa constante, o indutor é adicionado à cultura por alimentação DO-stat ou o indutor é adicionado à cultura por alimentação pH-stat.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é adicionado à cultura a uma taxa constante de cerca de 3,35 g/L/h a cerca de 16 g/L/h, o indutor é adicionado à cultura por alimentação DO-stat ou o indutor é adicionado à cultura por alimentação pH-stat.

35. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura é de cerca de 4 g/L a cerca de 40 g/L.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura é de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura é de cerca de 7 g/L a cerca de 15 g/L.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura é de cerca de 10 g/L.

39. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que compreende o isolamento da

proteína recombinante da cultura cerca de 2 horas a cerca de 8 horas após o início da alimentação de indutor.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que compreende o isolamento da  
5 proteína recombinante da cultura cerca de 3 horas a cerca de 6 horas após o início da alimentação de indutor.

41. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono é adicionada à cultura celular durante a alimentação a taxa  
10 constante tanto da fonte de carbono, quanto do indutor, durante a alimentação DO-stat tanto da fonte de carbono, quanto do indutor ou durante a alimentação pH-stat tanto da fonte de carbono, quanto do indutor.

42. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é arabinose.  
15

43. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono é uma fonte de carbono à base de açúcar.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono à base de  
20 açúcar é glicose.

45. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono é glicose, e o indutor é arabinose.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da glicose à cultura celular enquanto a arabinose é continuamente adicionada à cultura celular.  
25

47. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição contínua da glicose à cultura celular até que a densidade celular da cultura celular atinja uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

5 48. Método para a produção de uma proteína recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende:

cultivar uma célula bacteriana recombinante para expressar uma proteína recombinante por adição contínua de um indutor a uma cultura compreendendo a célula bacteriana após a cultura atingir um parâmetro de limiar, em que a 10 célula bacteriana compreende uma sequência de ácido nucléico correspondente a um gene de *N. meningitidis* sorogrupo B.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de limiar é a 15 densidade óptica (OD), oxigênio dissolvido (DO), pH, concentração de nutriente no meio de cultura, concentração total da fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, ou qualquer combinação desses.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, 20 **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de limiar é a densidade óptica (OD) da cultura.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação contínua de indutor é iniciada quando a densidade celular da cultura 25 atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 70 a cerca de 110.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação contínua de

indutor é iniciada quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 70 a cerca de 105.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação contínua de indutor é iniciada quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 75 a cerca de 85.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação contínua de indutor é iniciada quando a densidade celular da cultura atinge uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

55. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é adicionado à cultura a uma taxa constante de cerca de 3.35 g/L/h a cerca de 16 g/L/h, o indutor é adicionado por alimentação DO-stat ou o indutor é adicionado por alimentação pH-stat.

56. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura durante a indução é de cerca de 4 g/L a cerca de 40 g/L.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura durante a indução é de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada ao meio de cultura durante a indução é de cerca de 7 g/L a cerca de 15 g/L.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade total de indutor adicionada à cultura durante a indução é de cerca de 10 g/L.

5 **caracterizado** pelo fato de que a alimentação de indutor continua durante cerca de 2 horas a cerca de 8 horas após o início do método.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação de indutor  
10 continua durante cerca de 3 horas a cerca de 6 horas após o início do método.

62. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a proteína recombinante é colhida cerca de 2 horas a cerca de 8 horas após o início da  
15 alimentação de indutor.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que o produto de proteína recombinante é isolado cerca de 3 horas a cerca de 6 horas após o início da alimentação de indutor.

20 64. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a alimentação de fonte de carbono ao meio de cultura continua durante a alimentação de indutor à cultura.

25 65. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o indutor é arabinose.

66. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono é uma fonte de carbono à base de açúcar.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, **caracterizado** pelo fato de que a fonte de carbono à base de açúcar é glicose.

5 68. Método, de acordo com a reivindicação 67 **caracterizado** pelo fato de que o indutor é arabinose.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a glicose é alimentada à cultura a uma taxa constante durante a alimentação a taxa constante de arabinose à cultura, durante DO-stat tanto de glicose, quanto do indutor ou por alimentação pH-stat tanto de glicose, quanto do indutor.

70. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a glicose é alimentada à cultura a uma taxa constante durante a alimentação a taxa constante de arabinose à cultura, por alimentação DO-stat tanto de glicose, quanto do indutor até que a densidade celular na cultura atinja uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80 ou por alimentação pH-stat tanto de glicose, quanto do indutor até que a densidade celular na cultura atinja uma OD<sub>600</sub> de cerca de 80.

71. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a proteína 2086 meningocócica recombinante compreende uma lipoproteína (rLP2086).

25 72. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a proteína compreende uma proteína não lipídica.

73. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a proteína compreende proteína 2086 meningocócica subfamília A.

74. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a proteína compreende proteína 2086 meningocócica subfamília B.

75. Método para a produção de uma proteína 2086 meningocócica recombinante (P2086) **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) a introdução em uma célula hospedeira bacteriana de um vetor de expressão que codifique uma proteína 2086 recombinante sob o controle de um promotor induzível para formar uma célula bacteriana recombinante;

(b) a introdução da célula bacteriana recombinante em um meio de cultura para formar uma cultura;

(c) a adição de uma fonte de carbono à cultura;

(d) a monitorização do crescimento celular na cultura quanto a atingir uma densidade óptica de limiar (OD);

(e) a adição contínua de um indutor do promotor induzível à cultura uma vez que a densidade celular da cultura atinja uma densidade óptica de cerca de 70 a 110; e

(f) o isolamento da proteína 2086 meningocócica recombinante da cultura após cerca de 3 horas a cerca de 6 horas após o começo da adição contínua do indutor.

76. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

uma cultura bacteriana compreendendo uma proteína 2086 meningocócica recombinante a uma densidade de pelo menos cerca de 1,5 g/L com base no volume total da cultura bacteriana.

5           77. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a proteína 2086 meningocócica recombinante é proteína lipídada.

78. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a proteína 2086 meningocócica recombinante é proteína não lipídada.

79. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a proteína 2086 meningocócica recombinante é uma proteína 2086 da subfamília A.

80. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a proteína recombinante é uma proteína 2086 da subfamília B.

81. Composição, de acordo com a reivindicação 80, **caracterizada** pelo fato de que a cultura compreende uma segunda proteína 2086 meningocócica recombinante.

20           82. Composição, de acordo com a reivindicação 81, **caracterizada** pelo fato de que a segunda proteína 2086 meningocócica recombinante é uma proteína 2086 da subfamília A.

83. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a densidade da proteína 2086 meningocócica recombinante é de pelo menos cerca de 1,7 g/L com base no volume total da cultura bacteriana.

84. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a densidade da proteína 2086 meningocócica recombinante é de pelo menos cerca de 2,0 g/L com base no volume total da cultura bacteriana.

5 85. Composição, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a densidade da proteína 2086 meningocócica recombinante é de pelo menos cerca de 3,0 g/L com base no volume total da cultura bacteriana.

10 86. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

uma cultura bacteriana compreendendo uma proteína 2086 meningocócica recombinante preparada de acordo com o processo de qualquer uma das reivindicações de 1 a 75.

Fermentação por batelada alimentada a várias taxas de alimentação constantes, sem indução

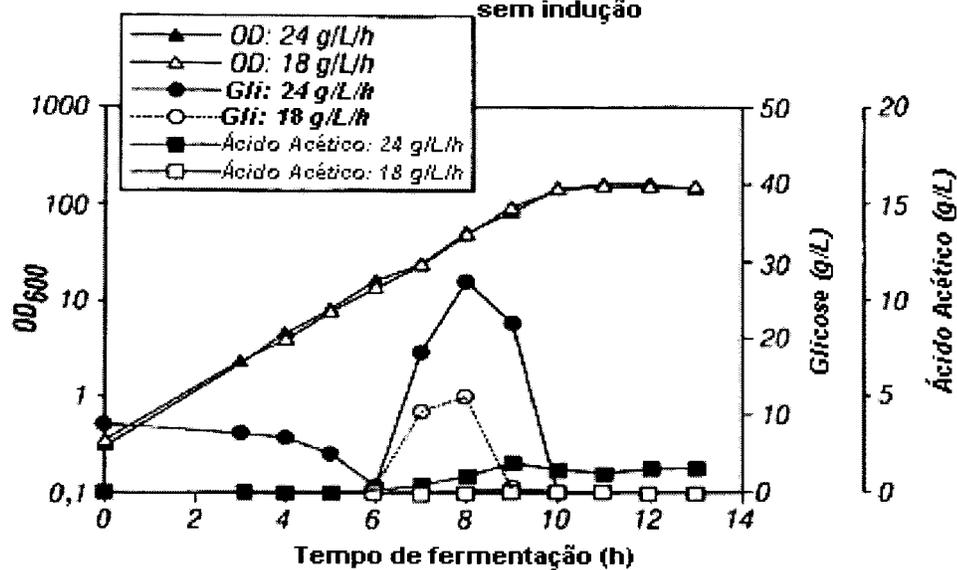


FIG. 1

Fermentação por batelada alimentada a várias taxas de alimentação constantes, sem indução

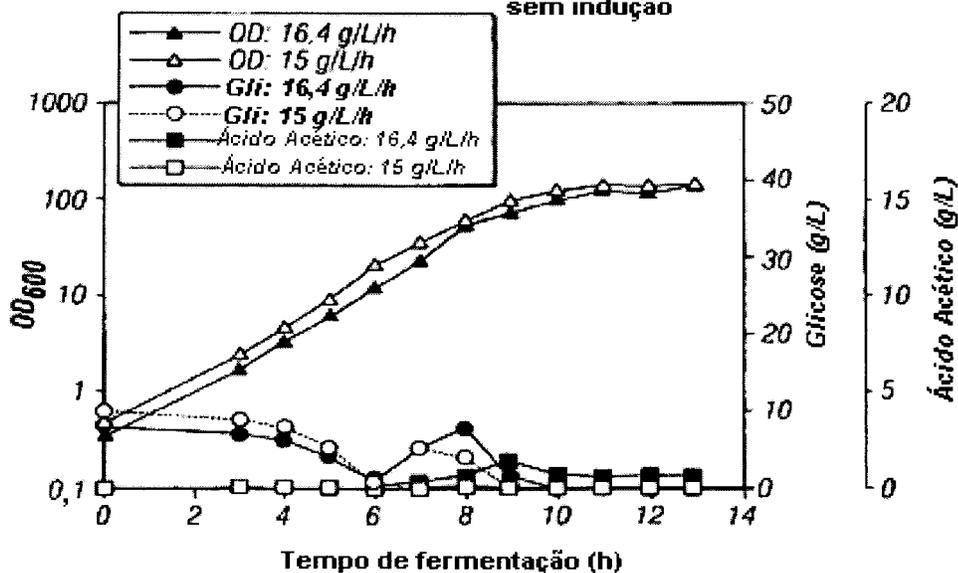
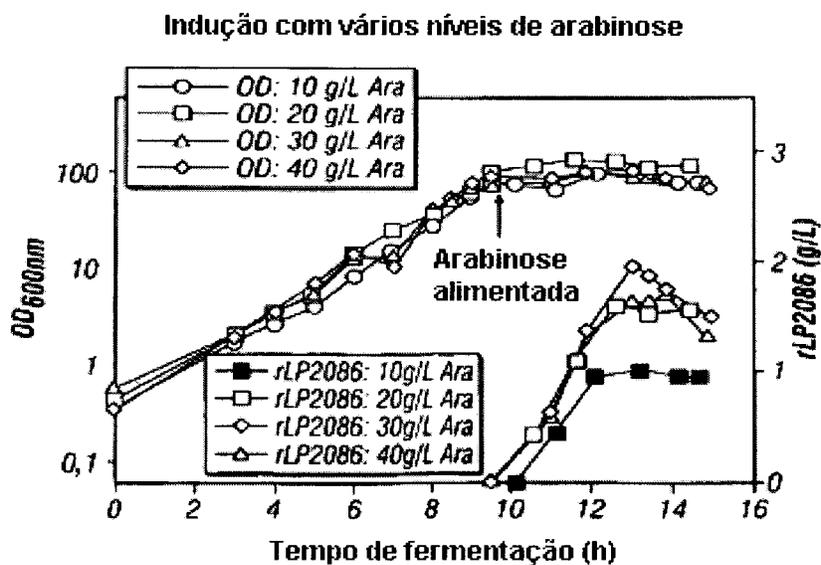
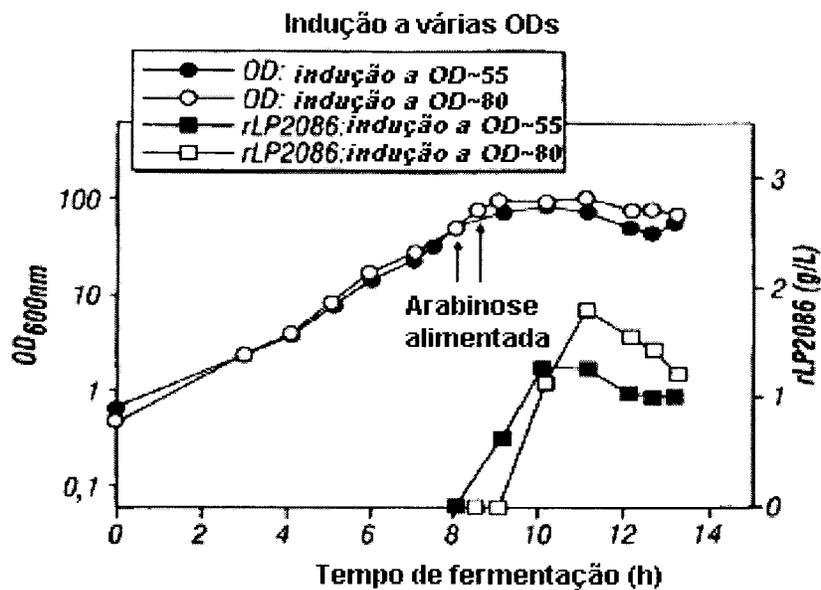


FIG. 2



## Efeito do método de adição de arabinose sobre o rendimento de rLP2086

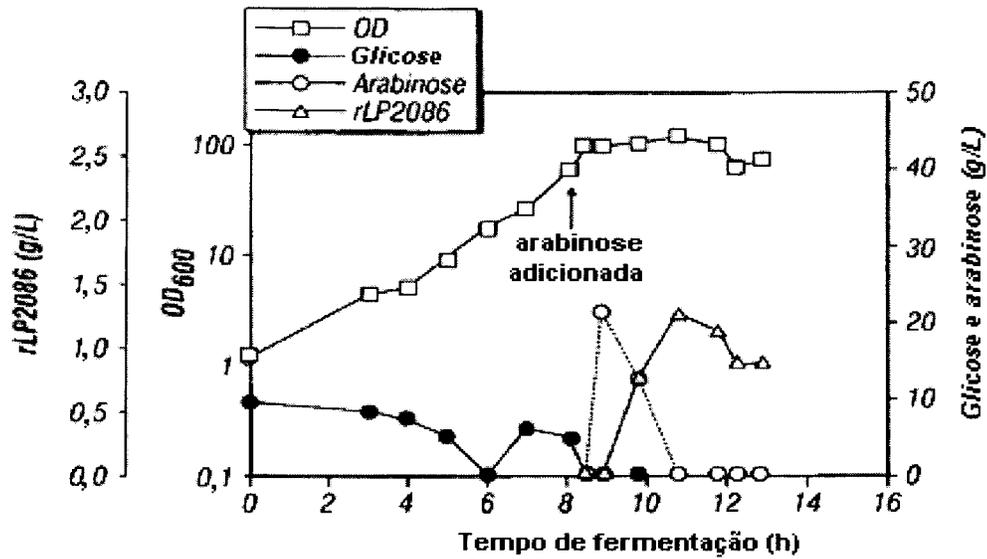


FIG. 5

## Efeito da taxa de alimentação de arabinose sobre a produção de rLP2086

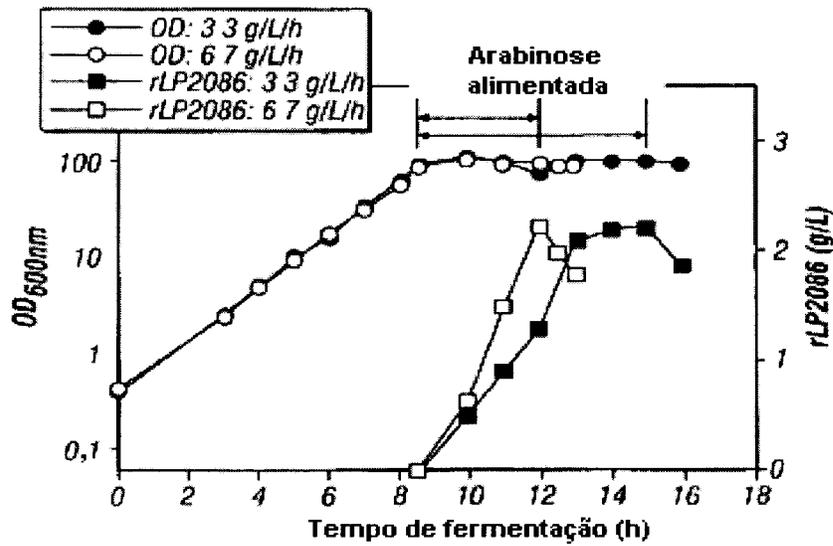


FIG. 6

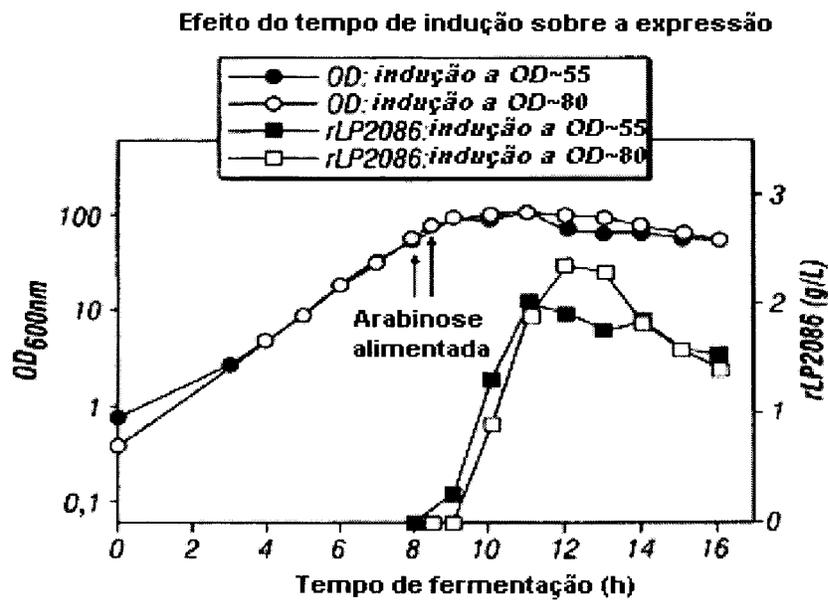


FIG. 7

Fermentação por batelada alimentada para produção de rLP2086 subfamília B

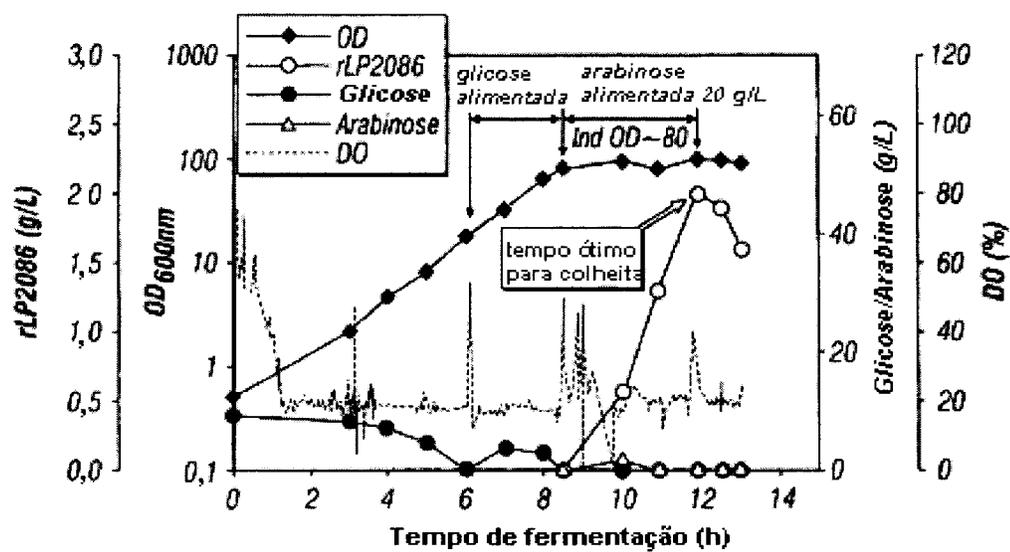


FIG. 8

SDS-PAGE e Western Blot da indução de rLP2086 subfamília B

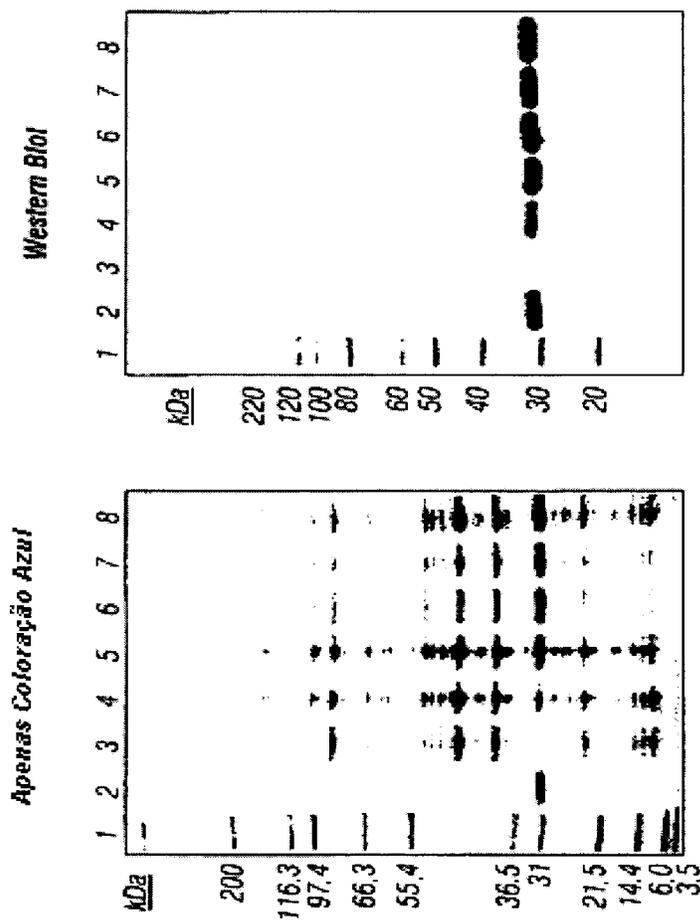


FIG. 9A

No quadro: Pista 1. PM padrão; Pista 2. rLP2086; Pista 3. Pré-indução; Pista 4. 1,1 h; Pista 2,0 h; Pista 6. Indução 3,0 h; Pista 7. Indução 3,6 h; Pista 8. Indução 4,0 h

FIG. 9B

Fermentação por batelada alimentada otimizada para produção de rLP2086 subfamília A

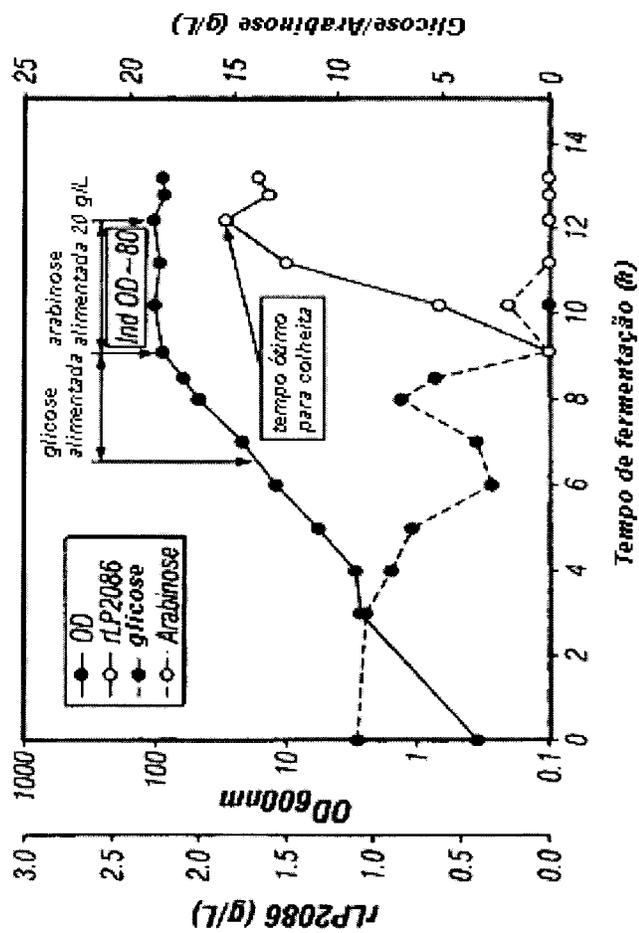


FIG. 10

SDS-PAGE e Western Blot da indução de rLP2086 subfamília A

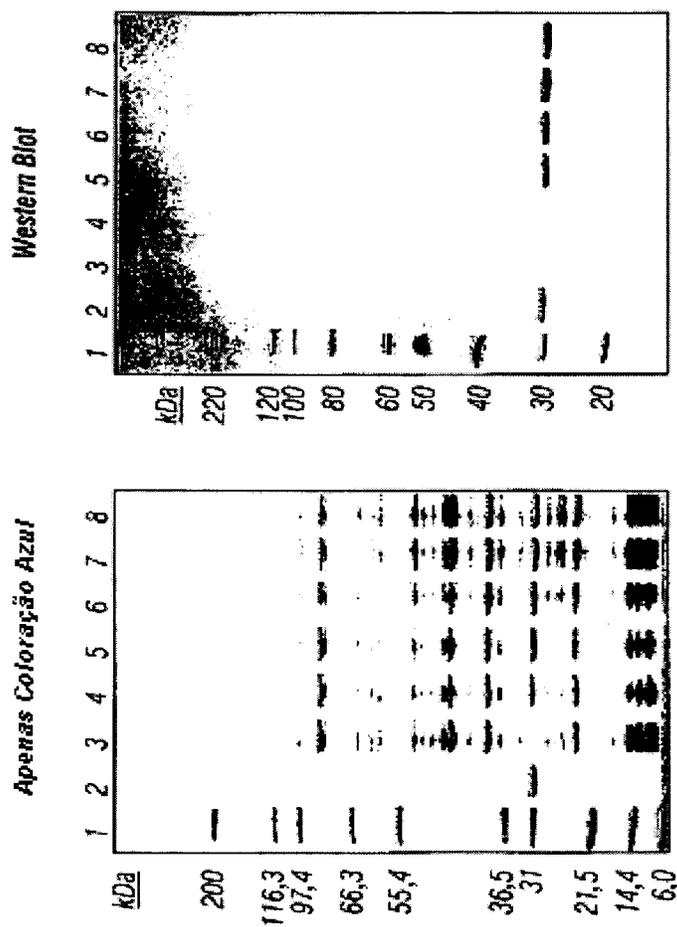
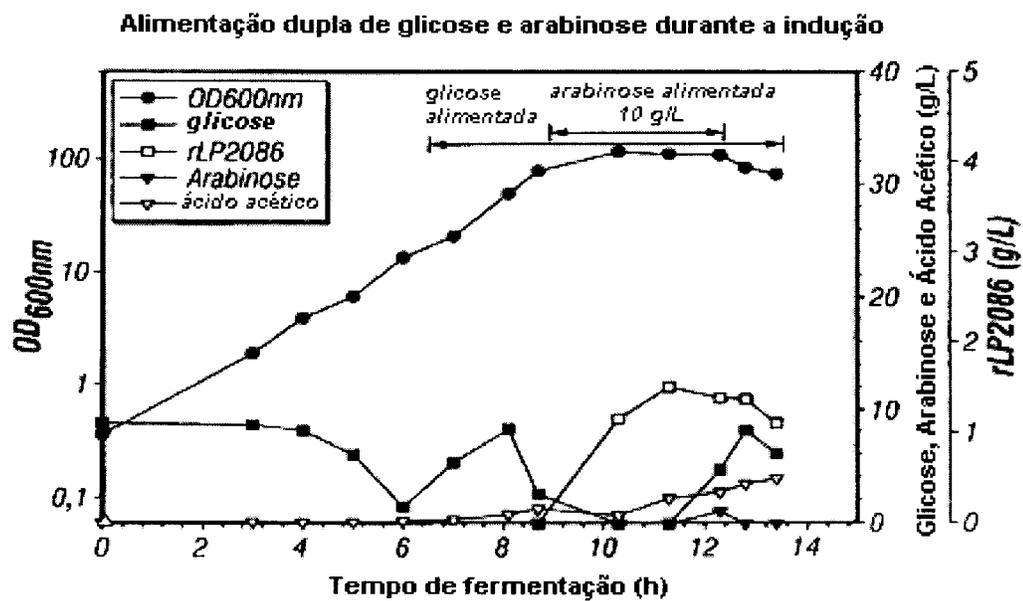


FIG. 11A

FIG. 11B

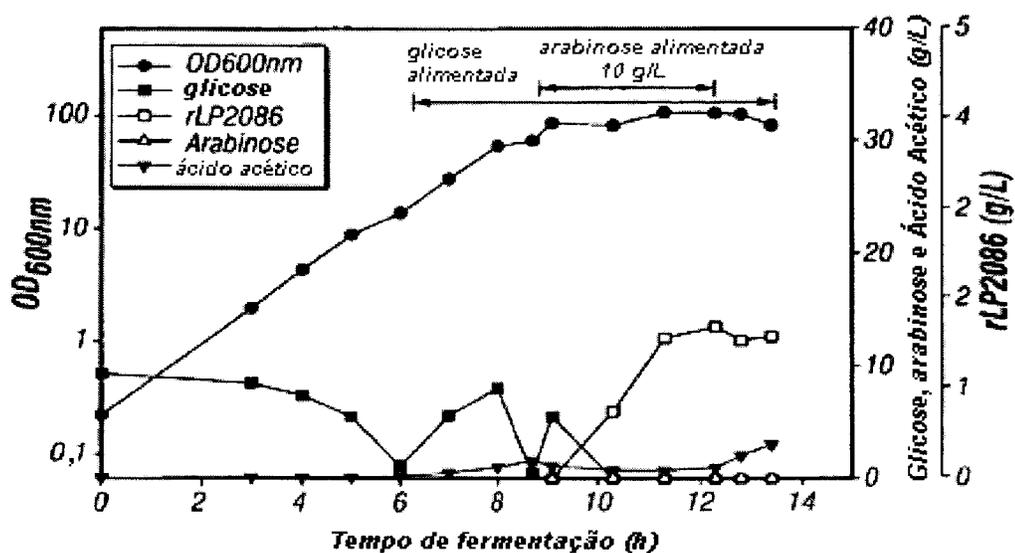
No quadro: Pista 1. PM padrão; Pista 2. rLP2086 (A); Pista 3. Pré-indução; Pista 4. 1,1 h; Pista 5. Indução 2,0 h; Pista 6. Indução 3,1 h; Pista 7. Indução 3,6 h; Pista 8. Indução 4,0 h



Alimentação dupla: alimentação de glicose a 15 g/L/h; alimentação de arabinose a 3,3 g/L/h

**FIG. 12A**

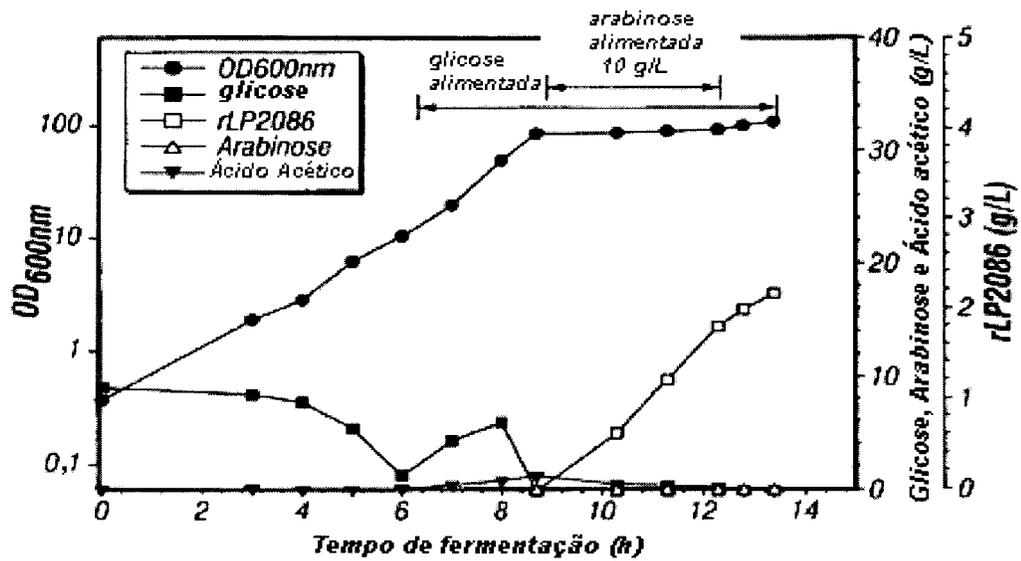
## Alimentação dupla de glicose e arabinose durante a indução



Alimentação dupla: alimentação de glicose a 15 g/L/h; alimentação de arabinose a 3,3 g/L/h

FIG. 12B

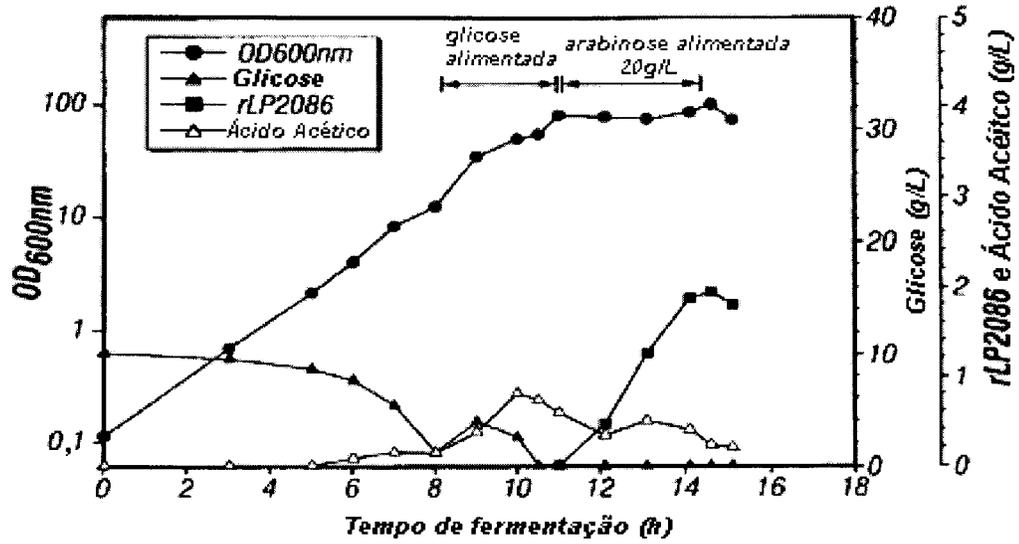
## Alimentação dupla de glicose e arabinose durante a indução



Alimentação dupla: alimentação de glicose a 3,75 g/L/h; alimentação de arabinose a 3,3 g/L/h

FIG. 12C

**Fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília B de *E. coli* (pPW62) a uma escala de 100 L**



**FIG. 13A**

Fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília A de *E. coli* (pPW102) a uma escala de 100 L.

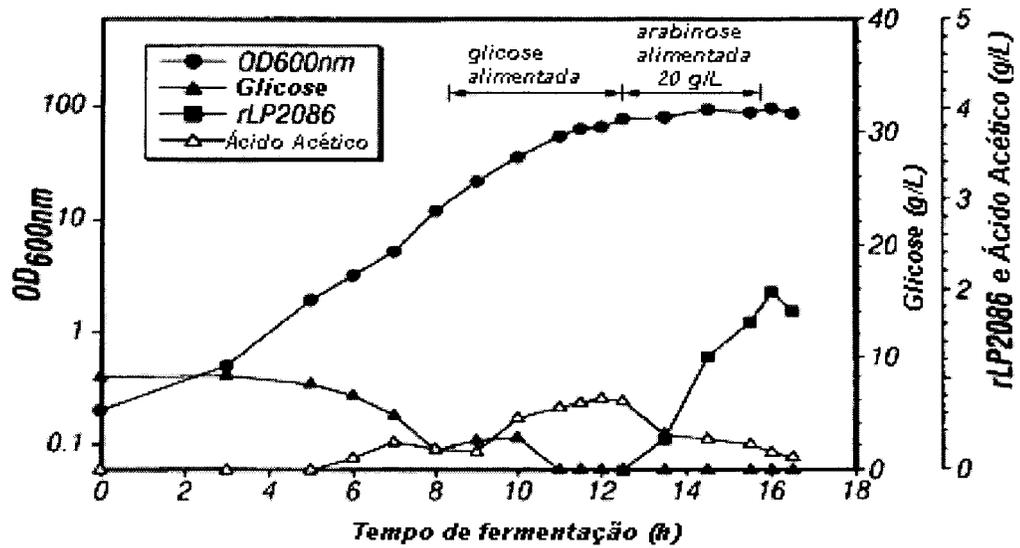


FIG. 13B

Fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília B de *E. coli* (pPW62) com alimentação dupla de glicose e arabinose a uma escala de 100 L

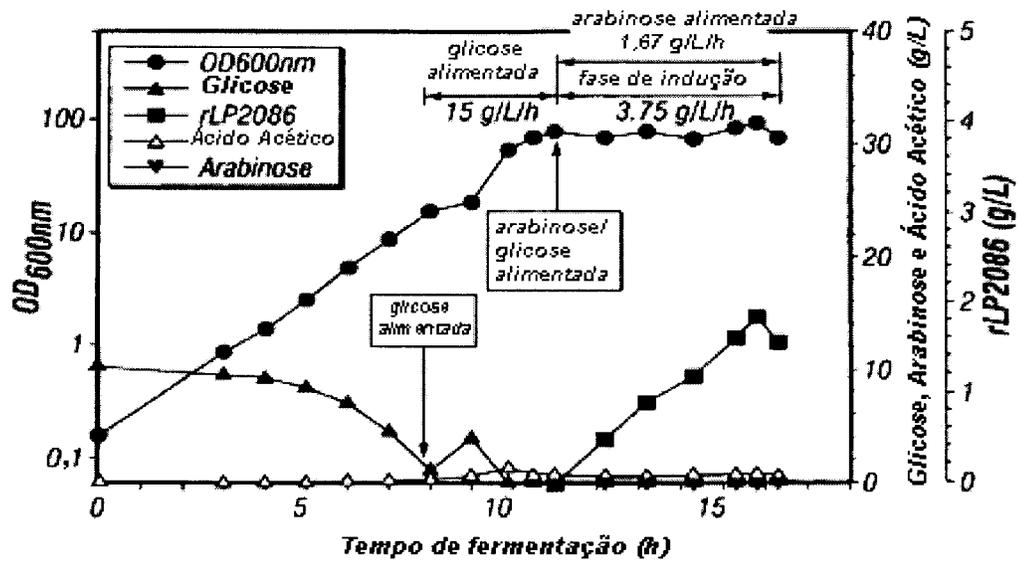


FIG. 14A

Fermentação por batelada alimentada de rLP2086 subfamília A de *E. coli* (pW62) com alimentação dupla de glicose e arabinose a uma escala de 100 L

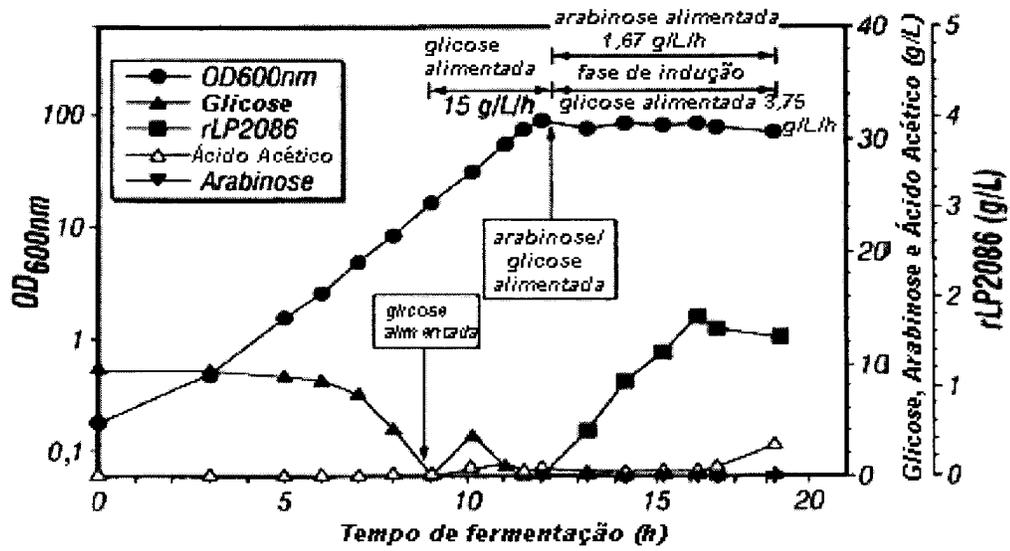


FIG. 14B

## RESUMO

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE; MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA 2086 MENINGOCÓCICA RECOMBINANTE (P2086); E COMPOSIÇÃO".

5           Apresentam-se métodos para a produção de  
-           proteínas, por exemplo, proteínas 2086 meningocócicas  
-           recombinantes, usando fermentação por batelada alimentada  
-           com entrada contínua de um indutor depois de se atingir um  
-           parâmetro de limiar e, opcionalmente, a entrada contínua de  
10           uma fonte de carbono, por exemplo, uma entrada a taxa  
            constante, para melhorar os rendimentos de proteína, assim  
            como composições de proteínas de alta densidade e  
            composições para uso nos métodos da presente invenção.