



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 306 981**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04706187 .4**

(86) Fecha de presentación : **29.01.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1592703**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

(54) Título: **Método para aislamiento de proteínas en condiciones anóxicas.**

(30) Prioridad: **31.01.2003 EP 03100208**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

(73) Titular/es: **N.V. Organon**
Kloosterstraat 6
5349 AB Oss, NL

(72) Inventor/es: **Van der Meijden, Peter;**
Van Dedem, Gijsbert, Willem, Karel;
Eppink, Michel, Hendrikus, Maria y
Wassenaar, Roeland, Wilhelmus

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aislamiento de proteínas en condiciones anóxicas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para el aislamiento de proteínas. Mas particularmente, la presente invención proporciona métodos para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa.

10 **Antecedentes de la invención**

La hormona peptídica humana insulina controla los niveles de glucosa en sangre durante la alimentación y el ayuno y actúa a través de receptores de la superficie celular de células hepáticas y del tejido adiposo. Aparte de controlar la captación, el almacenamiento y la producción de glucosa, la insulina también está implicada, entre otros, en el control de la producción y de la degradación de lípidos.

Las deficiencias en el suministro de insulina dan como resultado concentraciones elevadas de glucosa en sangre (hiperglucemia) y, en forma crónica, se ponen de manifiesto por los síntomas clásicos de la diabetes mellitus (DM). Se administra insulina diariamente a pacientes que padecen DM.

La insulina humana madura es un péptido que está compuesto por una cadena A (alfa) y una B (beta), unidas por 2 puentes disulfuro intercatenarios. Un tercer puente disulfuro conecta dos restos de la cadena A. En la proinsulina, el precursor biosintético, las cadenas A y B, están conectadas entre sí por el péptido C, cuyo papel es ayudar en la formación apropiada de puentes disulfuro entre los segmentos A y B y permitir un plegamiento apropiado de la molécula de proinsulina. En la última fase de la maduración, las enzimas proteolíticas la escinden en restos aminoacídicos específicos para liberar el péptido C, formando de este modo la insulina madura.

Actualmente, la insulina humana recombinante biosintética se fabrica, entre otros, como polipéptidos similares a proinsulina expresados en, por ejemplo, *E. coli* o levaduras (véase, por ejemplo, el documento US 5.593.860). En la mayoría de los casos, la proinsulina se produce como una proteína de fusión o como un híbrido recombinante, en el que la proinsulina se entrecruza a través de restos de metionina con una heteroproteína, tal como, por ejemplo, la superóxido dismutasa de cobre y zinc humana (hSOD). Normalmente, estos híbridos se acumulan en las células recombinantes como una proteína intracelular precipitada o como cuerpos de inclusión.

Durante la fabricación de proinsulina recombinante, los cuerpos de inclusión obtenidos por centrifugación después de la lisis de las células se lavan con un detergente o con un agente desnaturizante a una baja concentración. Dicho tratamiento se repite para aumentar la pureza de la proteína deseada. Para minimizar las interacciones hidrófobas intermoleculares y la formación de enlaces disulfuro incorrectos, los cuerpos de inclusión lavados se disuelven en un agente desnaturizante, tal como una solución de urea o guanidina-HCL que contiene un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o 2-mercaptoetanol, y se recuperan por precipitación.

El híbrido se aísla normalmente y se escinde mediante bromuro de cianógeno (CNBr) para liberar el polipéptido de proinsulina de la heteroproteína. La proinsulina se modifica adicionalmente mediante sulfitólisis oxidativa hasta S-sulfonato de proinsulina (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 055 945 y EP 0 196 056). Después, el S-sulfonato de proinsulina se purifica adicionalmente y se vuelve a plegar en una conformación nativa en condiciones reductoras mediante el uso de agentes reductores tales como ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, etc. o un sistema redox tal como glutatión. La conversión de la proinsulina en insulina, es decir, la eliminación del péptido C, se consigue mediante la acción combinada de tripsina y carboxipeptidasa B. Por último, la insulina se purifica mediante, por ejemplo, una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) y, opcionalmente, se cristaliza.

Durante el procedimiento completo de aislamiento, desde la lisis de las células recombinantes hasta el plegamiento apropiado de la proinsulina, los grupos tiol libres de los restos de cisteína comprendidos en la proteína (de fusión) pueden formar puentes disulfuro intra o intermoleculares incorrectos o inespecíficos. Esto da como resultado péptidos mezclados (*scrambled*) y hormonas inactivas o la formación de "agregados" de las proteínas deseadas y de proteínas contaminantes (documento US 6.150.134). Por lo tanto, los grupos tiol libres deberían bloquearse para prevenir la formación de puentes disulfuro incorrectos o los procedimientos deberían implicar la escisión de forma selectiva de enlaces disulfuro incorrectos.

La escisión de enlaces disulfuro pueden conseguirse, entre otros, mediante: a) la modificación de los restos de cisteína en ácido cisteico mediante la oxidación con ácido cisteico o el tratamiento con ácido per fórmico; b) la modificación de la cisteína en S-sulfo-cisteína mediante sulfitólisis ($R-S-S-R \rightarrow 2R-SO_3^-$); c) la reducción por medio de determinados agentes reductores, tales como fosfinas o mercaptanos (véase, por ejemplo, el documento EP 0 379 162).

Sin embargo, se prefiere prevenir la formación de enlaces disulfuro incorrectos en lugar del uso de agentes de "redistribución de óxidos" después del aislamiento de proteínas y, para conseguirlo, de nuevo se usan más comúnmente varios agentes reductores, tales como ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, cisteína, glutatión, E-mercaptoetilamina o ácido tioglicólico.

Sin embargo, el uso de todos los agentes reductores mencionados anteriormente plantea problemas por el hecho de que poseen un riesgo tóxico, son costosos y porque su contaminación del producto requiere una purificación adicional.

- 5 Por lo tanto, el proceso convencional para la preparación de proinsulina recombinante ha demostrado ser menos satisfactorio, puesto que implica etapas complicadas de disolución y sulfonación, purificación, concentración, en las que el repliegamiento de la proinsulina evoluciona de una forma ineficaz, dando como resultado rendimientos reducidos de la proteína deseada.
- 10 Por consiguiente, existe una necesidad de un proceso mejorado para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, de una forma eficaz y menos contaminante.

Sumario de la invención

- 15 Los presentes inventores han descubierto que el uso de agentes reductores en el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro puede evitarse o al menos reducirse sustancialmente mediante la realización de dicho aislamiento en una atmósfera esencialmente anóxica. R. Hermann (Protein folding, EPO, Rijswijk, Países Bajos, 1990), páginas 89-90, describe la influencia de condiciones oxidantes y reductoras en el repliegamiento de proteínas. Sin embargo, no describe el uso de una atmósfera completamente anóxica en el repliegamiento de proteínas, sino
- 20 sólo una atmósfera saturada de nitrógeno. El documento WO-A-9933988 (Chong Kun Dang Corporation) describe un proceso para el repliegamiento de insulina en una atmósfera saturada de nitrógeno.

La presente invención proporciona un método para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, comprendiendo dicho método el aislamiento de dichas proteínas en condiciones esencialmente anóxicas.

Mediante el uso del método de la presente invención, ahora pueden extraerse y aislarse a partir del entorno proteínas que comprenden enlaces disulfuro sin la necesidad del uso de agentes reductores molestos. Una de las ventajas del método de la presente invención es que ya no es necesaria la extracción de dichos agentes reductores a partir del

30 producto proteico aislado y purificado y que, por lo tanto, el procedimiento de aislamiento es más eficaz. Además, un método de la invención previene la formación de conformaciones mezcladas de proteínas y da como resultado un elevado rendimiento de proteínas en su conformación nativa estable.

Descripción de las figuras

35 La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de las etapas principales del procedimiento comprendido por un método de la invención.

La Figura 2 ilustra el efecto del rociado de alícuotas de 40 ml de suspensiones de cuerpos de inclusión aislados, como se describe en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

Los términos “purificación” o “que purifica” y “aislamiento” y “que aísla”, como se usan en la presente memoria, se definen como el proceso de liberación y obtención de un único constituyente, tal como una especie macromolecular definida, a partir de una mezcla de constituyentes, tal como a partir de un cultivo de células recombinantes. En particular, un procedimiento de aislamiento en la presente memoria implica la recogida y lisis de las células, la extracción de proteínas particulares a partir de un extracto celular bruto obtenido de dicha lisis y puede comprender adicionalmente las diversas etapas de aislamiento de estructuras subcelulares, tales como cuerpos de inclusión que comprenden las

45 proteínas deseadas, de otros componentes celulares tales como ácidos nucleicos o polisacáridos. Más en particular, un procedimiento de purificación en la presente memoria implica el proceso de aislamiento de una proteína en una forma bastante pura, es decir, liberándola de impurezas adicionales tras su aislamiento.

Los términos “aislado” y “purificado” se refieren a cualquier molécula o compuesto que esté separado de su entorno natural y que esté de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 90% libre, preferiblemente del 80% al 99% libre de otros componentes con los que se asocia naturalmente.

El término “recombinante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína o construcción de ácido nucleico, generado de forma recombinante o sintéticamente, por ejemplo, en el caso de una proteína, mediante la traducción del transcrito de ARN de una serie de elementos de ácido nucleico determinados asociados con un vector o plásmido en particular o de un casete de expresión en una célula hospedadora. El término “recombinante”, como se usa en la presente memoria, no abarca la alteración de la célula o vector por acontecimientos de origen natural (por ejemplo, mutación espontánea, transformación, transducción o transposición natural), tales como los que se producen sin una intervención humana deliberada.

65 Por “célula hospedadora” se entiende una célula que contiene un vector o casete de expresión y contribuye a la replicación y/o expresión del mismo. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas, tales como de *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levaduras, insectos, anfibios o plantas o células de mamíferos. Preferiblemen-

te, las células hospedadoras son células bacterianas o procariotas. Una célula hospedadora particularmente preferida para la producción de insulina es una célula hospedadora de *E. coli*, preferiblemente la cepa Sφ733 de *E. coli*.

Como se usa en la presente memoria, el término “vector” incluye la referencia a un ácido nucleico usado en la transfección de una célula hospedadora y en el que puede insertarse un polinucleótido. A menudo los vectores son replicones.

Los términos “proteína” o “proteínas”, como se usan en la presente memoria, se refieren a un polipéptido o a cualquier porción del mismo.

El término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; por lo tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco se refiere a, ni excluye, modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como las modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

La expresión “proteína recombinante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a (1) un polipéptido de origen semisintético o sintético que es el resultado de la expresión de una combinación de moléculas de ADN de distinto origen que se unen usando tecnologías de ADN recombinante; (2) un polipéptido de origen semisintético ó sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con toda ni con una porción de una proteína con la que se asocia en la naturaleza; (3) un polipéptido de origen semisintético o sintético que está unido a un polipéptido distinto de aquel con el que está unido en la naturaleza; (4) un polipéptido de origen semisintético o sintético que no se da en la naturaleza.

Las expresiones “cuerpo de inclusión” y “cuerpo refráctil” se refieren a los agregados intracelulares que resultan de la precipitación inespecífica de proteínas individuales. Las formaciones de cuerpos de inclusión y cuerpos refráctiles es a menudo una consecuencia de un elevado nivel de producción de proteínas en el citoplasma. Se forman por acumulación de intermedios de plegamiento más que a partir de la proteína nativa o no plegada. Pueden formarse cuerpos de inclusión o cuerpos refráctiles por cualquiera o todas de las siguientes razones: naturaleza heteróloga de los polipéptidos expresados; elevada velocidad de expresión de proteínas; cantidad relativamente elevada de proteína hidrófoba que se agrega intermolecularmente como resultado de asociaciones no covalentes; y ausencia o disponibilidad inadecuada de chaperonas como proteínas auxiliares.

Las expresiones “enlace disulfuro” o “enlaces disulfuro”, como se usan en la presente memoria, se definen como uno o más, respectivamente, entrecruzamientos entre cadenas polipeptídicas o entre partes de una cadena polipeptídica formadas por la oxidación de restos de cisteína. El disulfuro resultante se denomina cistina.

La expresión “esencialmente anóxica”, como se usa en la presente memoria, se define como que es enormemente deficiente o que sustancialmente carece de oxígeno, y puede variar desde una reducción en el nivel de oxígeno que se encuentra normalmente en el aire, hasta una condición completamente carente de oxígeno de, por ejemplo, una atmósfera, un entorno líquido o un tejido.

La “conformación proteica” se refiere a la forma tridimensional característica de una proteína, incluyendo la estructura secundaria (hélices y láminas), supersecundaria (motivos), terciaria (dominios) y cuaternaria (proteínas multimericas) de la cadena peptídica.

La expresión “conformación nativa”, como se usa en la presente memoria, se refiere al estado, formación, forma o estructura característica de una proteína en la forma biológicamente activa en un sistema vivo en el que está plegada hasta un mínimo global de energía libre de Gibbs, como se define por C. B. Anfinsen (Conferencia Nobel, 11 de diciembre de 1972).

El “replegamiento” se refiere al proceso *in vitro* de transformación de una proteína después de una desnaturalización completa mediante escisión reductora de sus enlaces disulfuro en una proteína de conformación nativa.

Generalmente, no se encuentran proteínas con enlaces disulfuro en el citoplasma, con excepción de las sulhidrilos oxidoreductasas. Sin embargo, las proteínas que se exportan desde el citoplasma, tales como, por ejemplo, la insulina y la fosfatasa alcalina, contienen típicamente enlaces disulfuro. A menudo esto se atribuye a la diferencia en el potencial reductor entre el citoplasma y el entorno extracelular, por lo que se piensa que la presencia de tiorredoxina reductasas en el citoplasma constituye un factor importante. Diversos estudios han demostrado que tanto la actividad celular como la actividad tiorredoxina reductasa son necesarias para mantener las proteínas extracelulares, que comprenderían enlaces disulfuro oxidados en su conformación nativa, en una forma inactiva y reducida dentro del citoplasma (Derman *et al.*, 1993. Science 262: 1744-47; Derman y Beckwith. 1995. J. Bacteriol. 177: 3764-70).

Después de la lisis (o muerte celular o detención del crecimiento debido a un agotamiento del sustrato) las tiorredoxina reductasas ya no son capaces de mantener los restos de cisteína de proteínas en forma reducida y comienza

un plegamiento aleatorio de la proteína con oxidación concomitante de restos de cisteína en enlaces disulfuro. Este proceso a menudo da como resultado proteínas mezcladas o anormalmente plegadas.

Para obtener un extracto puro de proteínas en su conformación nativa que comprende la presencia de enlaces disulfuro, tales como, por ejemplo, insulina, a partir de material recombinante, la etapa clave está en la formación de enlaces disulfuro correctos.

Los métodos convencionales para el aislamiento de una proteína que comprende enlaces disulfuro en su conformación nativa dependen de la presencia de agentes reductores. Ahora se ha descubierto que la aplicación de condiciones anóxicas, desde el momento en el que disminuye el poder reductor de las tioredoxina reductasas hasta el momento en el que puede estabilizarse la proteína o en el que se proporcionan las condiciones para un plegamiento correcto, puede prevenir eficazmente la formación de proteínas mezcladas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, que comprende el aislamiento de dicha proteína en una atmósfera esencialmente anóxica.

El uso de un método de la presente invención dará como resultado un producto proteico aislado que está esencialmente libre de agentes reductores contaminantes, como se ha descrito anteriormente, y en el que una parte importante y sustancial de las proteínas están activas y en el estado conformacional nativo y biológicamente activo.

Las proteínas adecuadas que pueden usarse en un método de la invención son esencialmente proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, pero también pueden aislarse otros péptidos mediante un método de la invención. Son proteínas muy adecuadas, por ejemplo, hormonas peptídicas tales como insulina, vasopresina, somatostatina, octreotida, endotelina I, proteínas de tipo knotina, enzimas tales como ribonucleasa, epítotos tales como epítotos de la toxina Cn2 del escorpión, conotoxina y/o módulos del epítoto receptor de LDL.

En general, las proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos ricos en disulfuros, ya sean de virus, bacterias, hongos (incluyendo levaduras), plantas, animales o humanos, son valiosos para el estudio de las relaciones estructura-actividad, por ejemplo, en el diseño de fármacos. Por lo tanto, también para este campo de la ciencia, las posibilidades de la presente invención de lograr más eficazmente la conformación nativa de estas proteínas tienen importantes beneficios.

Un método de la invención es adecuado para el aislamiento de proteínas de cualquier fuente que comprenden enlaces disulfuro en la conformación nativa, tales como asociadas a un virus o un prión o producidas por un organismo procariota, tal como una bacteria, o producidas por un organismo eucariota, tal como una célula de una levadura, un hongo, una planta, un animal o humana. Preferiblemente, dicha proteína es una proteína extracelular que está en la forma o estado reducido cuando se expresa en el citosol de una célula del organismo que la produce y que consigue su conformación nativa cuando está en el estado oxidado.

El especialista es capaz de determinar si una proteína que contiene enlaces disulfuro está (re)plegada apropiadamente y en la conformación nativa. Dichas determinaciones pueden comprender, por ejemplo, la medición del intermedio apropiadamente plegado, oxidado y digerido Lys-Arg-insulina, mediante análisis de HPLC.

Preferiblemente, se usa un método de la presente invención para el aislamiento de proteínas producidas de forma recombinante que comprenden enlaces disulfuro en la conformación nativa. Las proteínas producidas de forma recombinante pueden expresarse directamente o expresarse como una proteína de fusión. La detección de la proteína expresada se consigue por métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayos, técnicas de transferencia de Western o inmunoprecipitación.

El modo de producir o (bio)sintetizar una proteína (recombinante) no tiene importancia para el método de la presente invención. En principio, pueden prepararse proteínas recombinantes por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por métodos tales como los usados para la preparación de proteínas recombinantes, tal como, por ejemplo, mediante una levadura recombinante, más preferiblemente, mediante una bacteria recombinante, más preferiblemente, mediante una célula de *E. coli* recombinante, como se describe, por ejemplo, en el documento US 5.593.860. En muchos, pero no necesariamente en todos los casos, dichos métodos darán como resultado la formación de proteínas de fusión o híbridos. Por lo tanto, se usa muy convenientemente un método de la presente invención para el aislamiento de proteínas de fusión. En otra realización preferida, el método se usa para aislar proteínas tales que puedan producirse en cuerpos de inclusión. En una realización más preferida, el método de la invención se usa para el aislamiento de proteína precursora de insulina comprendida en cuerpos de inclusión, como se produce por la cepa recombinante de *E. coli* Sφ733, que lleva y expresa el plásmido pDBAST-R.AT-N71 (Bio Technology General Ltd., Rehovot, Israel), que procede del vector pDBAST-LAT (véanse los documentos US 6.001.604 o WO 96/20724).

El presente método implica la realización de un proceso convencional para el aislamiento de proteínas, por el que este proceso se realiza esencialmente en condiciones anóxicas. En un método de la invención, las etapas iniciales de recogida, lisis y extracción de proteína se realizan en condiciones anóxicas sin el uso de agentes reductores descrito anteriormente.

Un método de la invención comprende el aislamiento de una proteína en condiciones esencialmente anóxicas. Preferiblemente, las condiciones anóxicas se consiguen proporcionando el entorno de aislamiento con una atmósfera anóxica, tal como una atmósfera de nitrógeno, una atmósfera de dióxido de carbono o una atmósfera de helio u otro gas inerte. Más preferiblemente, se usa una atmósfera de N₂ en un método de la invención para proporcionar condiciones anóxicas durante el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en la conformación nativa.

Preferiblemente, una condición anóxica que se aplica en un método de la presente invención es una condición equivalente a una atmósfera que contiene entre el 0 y el 1% en vol., preferiblemente entre el 0 y el 0,5% en vol., aún más preferiblemente, entre el 0 y el 0,05% de O₂, o un líquido en equilibrio con dicha atmósfera. En una realización más preferida, la condición anóxica es una condición equivalente a una atmósfera que contiene esencialmente el 0% en vol. de O₂, o un líquido en equilibrio con dicha atmósfera.

En resumen, un método de la invención para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, no comprende el cultivo de células y/o la producción de las propias proteínas. Sin embargo, un método de la invención se realiza sobre un material que produce proteínas, tal como células de producción que contienen proteínas, desde el comienzo de la recogida de las células, incluyendo el lavado posterior a la recogida de las células, hasta la estabilización de las proteínas aisladas por congelación, por ejemplo, por congelación de los cuerpos de inclusión aislados.

Más en particular, cuando disminuye el potencial reductor en el citosol de la célula, como resultado de la actividad disminuida de las tioredoxina reductasas, por ejemplo, cuando las células dejan de crecer, por ejemplo, durante la recogida y los lavados posteriores a la recogida, preferiblemente las células ya se han llevado a condiciones anóxicas. Preferiblemente, las condiciones anóxicas se mantienen durante todo el proceso hasta el comienzo del replegamiento de la proteína.

Un método de la invención puede comprender convenientemente etapas tales como lisis celular, por ejemplo, mediante pretratamiento enzimático, seguido de rotura o fragmentación de las células, por ejemplo, por sonicación, tratamiento celular de prensa francesa o mezcla de alta cizalla, tal como tratamiento con Ultra-Turrax®, con tal de que dicha lisis se realice en condiciones anóxicas. Una etapa adicional en un método de la invención puede comprender la separación o aislamiento de los cuerpos de inclusión del citosol, en el caso de que la proteína deseada se produzca en el mismo, en condiciones anóxicas. Después de esta etapa es posible almacenar los cuerpos de inclusión aislados y estabilizar las proteínas comprendidas en los mismos, por ejemplo, por congelación, por ejemplo, a -20°C, o refrigeración, por ejemplo, a 2-8°C. Las etapas de proceso adicionales en el aislamiento y purificación de la proteína no se realizan necesariamente en condiciones anóxicas.

Después de sacarla del almacenamiento, o directamente después de las etapas de aislamiento anteriores, la proteína aislada y, opcionalmente, purificada adicionalmente puede volver a plegarse en la conformación nativa. Generalmente, para proteínas que contienen enlaces disulfuro, dicho replegamiento se realiza en una solución diluida para evitar la formación de puentes disulfuro intermoleculares no nativos. Un método muy apropiado para el replegamiento de la insulina comprende la disolución de la proteína en un tampón que contiene NaHCO₃ y EDTA a pH 12,0, la reducción del pH hasta 11,2, el tratamiento con carbón vegetal y la filtración. Después, los polipéptidos se pliegan por aplicación de aire a la solución para oxidar los disulfuros.

Para productos de fusión, puede realizarse una digestión posterior de la proteína de fusión con una enzima proteolítica apropiada para liberar la proteína recombinante deseada. El método de la invención puede comprender además la purificación hasta una pureza sustancial de las proteínas mediante técnicas convencionales bien conocidas en la técnica, incluyendo solubilización en detergentes, precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio, cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación, cromatografía de afinidad y otras. Véase, por ejemplo, R. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag: Nueva York (1982); Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press (1990).

La invención se ejemplificará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Después de la fermentación, el líquido de cultivo se lleva a condiciones anóxicas por cierre de la adición de aire presurizado, eliminación de la sobrepresión y lavado abundante del espacio superior por encima del cultivo y de los líquidos de proceso con nitrógeno. El lavado abundante del espacio superior con nitrógeno se continúa durante todas las etapas de procesamiento posteriores, que incluyen la recogida y el lavado de las células, la lisis de las células y los tratamientos adicionales de los cuerpos de inclusión. También se aplica un lavado abundante con nitrógeno al equipo de procesamiento, tal como a recipientes, contenedores y equipos auxiliares tales como centrifugas, homogeneizadores y unidades de filtración. El lavado abundante con nitrógeno se lleva a cabo usando un pipeteado fijo.

Ejemplo 1

Se cultivaron dos cultivos a escala de 450 l idénticos de la cepa de producción S ϕ 733/pDBAST-RAT-N-7-1, que produce precursor de insulina humana recombinante, a partir del contenido de ampollas de banco celular de trabajo idénticas. Se siguió la evolución de las fermentaciones y se analizaron muestras de ambos cultivos usando

ES 2 306 981 T3

procedimientos analíticos validados. Los resultados demuestran que ambos cultivos se desarrollaron de una forma muy comparable y que la absorbancia, el peso seco y las concentraciones finales de proteína y relativas de precursor de insulina obtenidas mostraron diferencias del 8% o inferiores.

- 5 Después de la fermentación, ambos cultivos se sometieron a procedimientos de recuperación de cuerpos de inclusión (IB) idénticos, que se muestran esquemáticamente en el diagrama de flujos de la Figura 1.

10 Durante el procedimiento de recuperación de IB se aplicó una capa protectora de gas nitrógeno sólo al último cultivo; el primer cultivo se manipuló en condiciones aeróbicas.

10 Después de la recuperación de IB los productos de cuerpos de inclusión obtenidos se sometieron a replegamiento y purificación a pequeña escala para determinar la cantidad de proteína precursora de insulina correctamente plegada usando HPLC.

- 15 Los análisis demostraron que, por litro de cultivo procesado en aerobiosis, el rendimiento del precursor de insulina correctamente oxidado, plegado y digerido ascendía sólo al 8,1%, en comparación con el rendimiento del cultivo procesado en condiciones anóxicas.

Ejemplo 2

20 Se pueden demostrar los efectos de las diferentes condiciones atmosféricas en el aislamiento de péptido insulina. Esto se realizó mediante experimentos en los que se repartió una suspensión de cuerpos de inclusión recuperados en condiciones anóxicas en 3 alícuotas de 40 ml. Estas alícuotas se rociaron durante 16 h usando el mismo caudal de gas nitrógeno, aire presurizado o gas oxígeno, respectivamente. Después, la suspensión y el material de partida se sometieron a replegamiento y purificación a pequeña escala para medir la cantidad de insulina que podía obtenerse. Los análisis demostraron que el rociado de las suspensiones de cuerpos de inclusión con aire presurizado o gas oxígeno daba como resultado rendimientos marcadamente reducidos de proteína plegada correctamente, mientras que el rociado durante 16 h con gas nitrógeno no tuvo dicho efecto sobre el rendimiento. Esto demuestra que el uso del método de la presente invención puede aumentar significativamente el rendimiento de proteína plegada correctamente cuando se excluye el oxígeno durante el procesamiento de los cuerpos de inclusión de precursor de insulina. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 2.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para el aislamiento de proteínas que comprenden enlaces disulfuro en su conformación nativa, comprendiendo dicho método el aislamiento de dicha proteína en condiciones esencialmente anóxicas.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas condiciones esencialmente anóxicas comprenden una atmósfera esencialmente anóxica.
- 10 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha proteína es una proteína híbrida recombinante presente como cuerpos de inclusión de células recombinantes.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho aislamiento comprende la recogida y la rotura de dichas células, el aislamiento de dichos cuerpos de inclusión y/o la estabilización del producto aislado.
- 15 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha proteína es una proteína precursora.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha proteína es insulina.
- 20 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha atmósfera esencialmente anóxica es una atmósfera de nitrógeno.
- 25 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células recombinantes son células de la cepa S ϕ 733 de *E. coli*, que lleva y expresa el plásmido pDBAST-RAT-N-7-1.

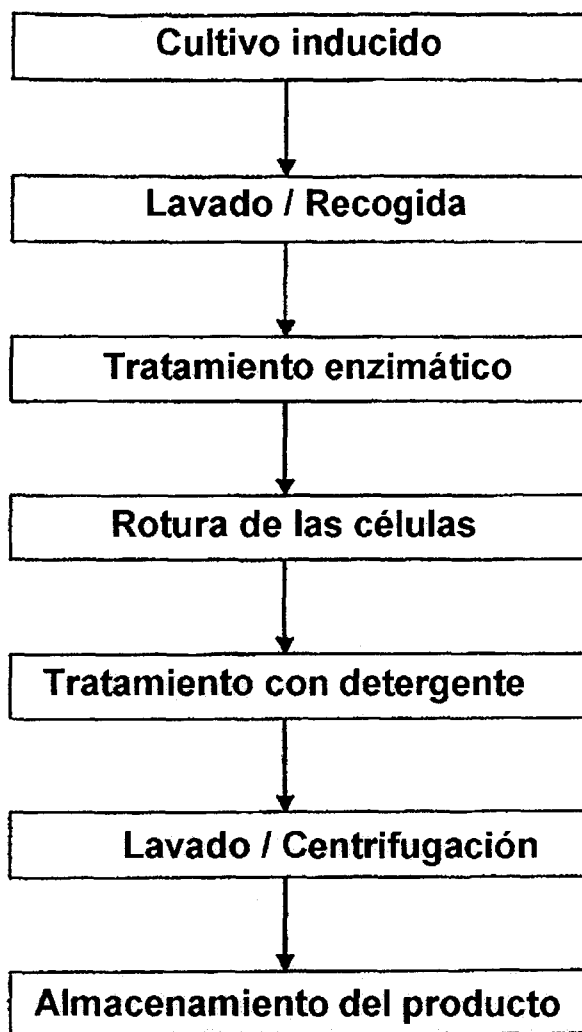


Figura 1

2

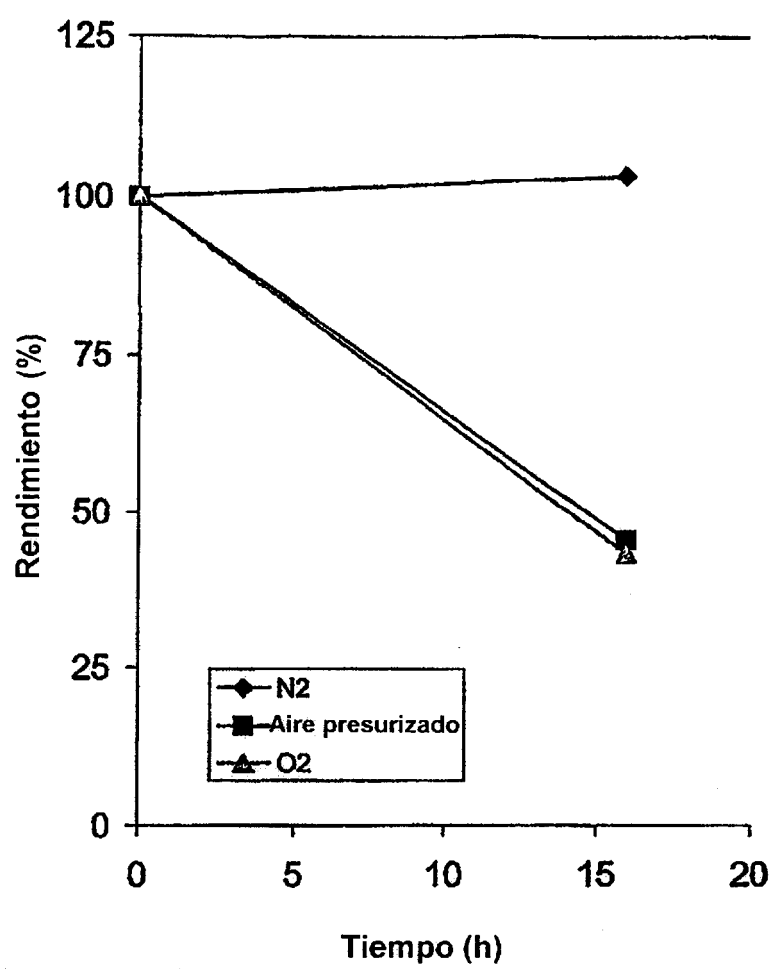


Figura 2