



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 696**

51 Int. Cl.:

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 14/815 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/17 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02719782 .1**

86 Fecha de presentación : **08.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1364032**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54

Título: **Uso de proteínas de fusión cuya parte N-terminal es un derivado de hirudina para la producción de proteínas recombinantes vía secreción por parte de levaduras.**

30

Prioridad: **20.02.2001 DE 101 08 211**

73

Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Bruningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

72

Inventor/es: **Habermann, Paul**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 272 696 T3

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

ES 2 272 696 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de proteínas de fusión cuya parte N-terminal es un derivado de hirudina para la producción de proteínas recombinantes vía secreción por parte de levaduras.

El desarrollo de procedimientos optimizados para producir productos farmacéuticos sobre la base de proteínas recombinantes es una tarea que tiene que hacer justicia a los puntos de vista siguientes. En primer lugar, un procedimiento tendría que ser tan rentable como fuera posible y, en segundo lugar, el producto debería ser de la más alta pureza. En esta dirección, la opción del sistema de expresión determina el curso del procedimiento de producción particular y, es obvio, en referencia al experto en la técnica, que el desarrollo de nuevas técnicas en la química de las proteínas y la amplia variedad de posibilidades bioquímicas y de nuevas combinaciones de las técnicas conocidas siempre hace mejores a los posibles procedimientos existentes. La expresión de las proteínas relevantes de esta clase en levaduras se usa ampliamente en este documento.

La producción de proteínas tales como la insulina, GM-CSF (Leukine®) e hirudina (Refludan®) es un ejemplo del desarrollo con éxito de procedimientos de ingeniería genética que están basados en la síntesis de proteínas particulares o sus precursores en levaduras. Generalmente, las levaduras pueden sintetizar directamente y particularmente sintetizan hirudinas con buenos rendimientos a escala de gramos usando *Hansenula polymorpha* (Weydemann *et al. Appl. Microbiol Biotechnol.* **44**: 377-385, 1995) o *Pichia pastoris* (Rosenfeld *et al. Protein Expr. Purif.* **4**, 476-82, 1996).

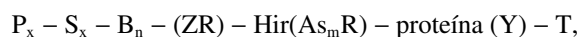
En la solicitud de patente europea 0 158 564 A1 se describen vectores para la expresión de hirudina o análogos de hirudina.

La solicitud de patente internacional WO 91/09125 describe que proteínas de fusión inactivas son activables por enzimas de cascada de coagulación que tienen actividad fibrinolítica y/o inhibitoria de la formación de coágulos. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende dos moléculas de hirudina o estreptoquinasa, unidas por una secuencia de enlace divisible, puede ser dividida para proporcionar hirudina anti-trombótica o estreptoquinasa fibrinolítica mediante la trombina o mediante el factor Xa.

La actividad fibrinolítica o inhibitoria de la formación de coágulos por lo tanto se dirige al sitio de formación del coágulo.

Winter *et al. (Journal of Biotechnology, 84 (2000) 175-185)* describe un método para la producción de altas cantidades de proinsulina soluble y silvestre humana en *E. coli* fusionando la proinsulina al extremo C de la disulfuro oxidoreductasa periplásmica DsbA vía un sitio de división de tripsina.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado ahora que las proteínas de fusión que contienen hirudina o derivados de hirudina en el extremo N pueden ser exportadas a partir de levaduras con buenos rendimientos similares que los de la hirudina misma. Los rendimientos están basados en la molaridad. Esto significa que un sistema de huésped/vector que produce rendimientos de 100 mg de hirudina silvestre por litro puede producir aprox. 180 mg por litro de proteína de fusión, que se hace hirudina y, por ejemplo, miniproinsulina que es como se describe en el documento EP 0 347 781. Sorprendentemente, la hirudina es biológicamente activa y la miniproinsulina está presente en la forma tridimensional correctamente plegada. Si las dos proteínas son fusionadas vía un enlazador de aminoácidos que específicamente son reconocidos por endoproteasas que dividen de manera eficiente la proteína de fusión en ninguna otra posición, entonces la proteína de interés puede ser dividida directamente y en la forma activa. En el caso de la producción de insulina, el enlazador entre hirudina y miniproinsulina preferiblemente contiene arginina en el extremo carboxi-terminal. En el procesamiento simultáneo es entonces posible por la conversión con tripsina dividir la parte de fusión y convertir la proinsulina en mono-Arg insulina. La invención se refiere así a una molécula de ADN (término alternativo: casete de expresión) de la forma:



P_x es cualquier secuencia de ADN promotora, seleccionada de tal modo que los rendimientos óptimos de la proteína de interés se vuelven factibles;

S_x es cualquier ADN que codifica una secuencia de señal o secuencia líder que permite rendimientos óptimos;

B_n es codones de 1-15 aminoácidos o un enlace químico;

Z es el codon de un aminoácido seleccionado a partir del grupo que comprende Lys y Arg;

R es un codon de Arg o un enlace químico;

As_m es un enlace químico o codones de m aminoácidos, en el que $m = 1-10$;

ES 2 272 696 T3

Hir es una secuencia de ADN que codifica para hirudina o un derivado de hirudina que es al menos un 40% homólogo respecto a la hirudina natural; en el que el derivado de hirudina puede ser exportado a partir de levadura con buenos rendimientos similares a los de la hirudina misma;

5 Proteína Y es una secuencia de ADN que codifica para una miniproinsulina; y

T es una secuencia de ADN no traducida que tiene un efecto estabilizante en el ARNm.

10 Las proteínas preferidas Y son polipéptidos tales como derivados de miniproinsulina, interleuquinas o linfoquinas o interferones. El casete de expresión preferiblemente se introduce en levaduras. Dicho casete de expresión puede tener una o varias copias establemente integradas en el genoma de levadura particular o puede estar presente extracromosómicamente en un vector de multicopia o en el tipo de elemento minicromosómico.

15 Otra realización de la invención es una proteína de fusión codificada por cualquiera de las moléculas de ADN anteriormente mencionadas.

Una realización más de la invención es un vector de multicopia y un plásmido que comprende la molécula de ADN anteriormente mencionada.

20 Una realización adicional de la invención es una célula huésped que comprende la molécula de ADN anteriormente mencionada, o el vector de multicopia anteriormente mencionado o el plásmido anteriormente mencionado, como una parte de su cromosoma, como una parte de un minicromosoma, o extra-cromosómicamente, en el que dicha célula huésped preferiblemente es una levadura, en particular, seleccionada a partir del grupo que comprende *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*.

25 Otra realización de la invención es un procedimiento para fermentar la proteína de fusión anteriormente mencionada, en el que:

30 (a) la molécula de ADN anteriormente mencionada, el vector de multicopia anteriormente mencionado, o el plásmido anteriormente mencionado son expresados en una célula huésped anteriormente mencionada, y

(b) la proteína de fusión expresada se aísla a partir del sobrenadante del cultivo celular,

35 en el que, en particular, después de la terminación de la fermentación, el pH se ajusta a 2,5-3,5 para precipitar proteínas no deseadas y la proteína de fusión expresada se aísla a partir del sobrenadante de la precipitación.

40 Otra realización de la invención es el procedimiento anteriormente mencionado, en el que el procedimiento después de la separación del sobrenadante de fermentación de las células huésped, las células huésped se cultivan repetidamente en medio recién preparado, y la proteína de fusión liberada se aísla de cada sobrenadante obtenido durante la cultivación.

45 Otra realización de la invención es el procedimiento anteriormente mencionado, en el que una etapa de procedimiento para concentrar la proteína expresada en el sobrenadante después de la precipitación se selecciona a partir de un grupo que comprende microfiltración, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico.

Una realización adicional de la invención es un procedimiento para preparar insulina, en el que:

50 (a) la proteína de fusión anteriormente mencionada se expresa y se aísla de acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado;

(b) la proteína de fusión se trata con tripsina y carboxipeptidasa B; y

55 (c) la insulina se aísla de la mezcla de reacción de la etapa (b).

60 El sistema de expresión descrito más abajo sirve como ejemplo. Es obvio para el experto en la técnica que, para introducir el casete de expresión en dicho sistema seleccionado, las construcciones de ADN recombinante apropiadas deben ser hechas dependiendo del tipo de sistema de huésped seleccionado. La fermentación industrial, en consecuencia, puede ser optimizada en relación con el sistema de huésped/vector seleccionado.

65 Sanguijuelas del tipo Hirudo han desarrollado, por ejemplo, varias isoformas de la hirudina inhibidora de trombina. La hirudina ha sido optimizada para requerimientos farmacéuticos por variación artificial de la molécula, por ejemplo, el intercambio del aminoácido del extremo N-terminal (por ej., documento EP 0 324 712). La invención incluye el uso de variantes de hirudina e hirudina. Las realizaciones particulares de la invención usan una de las isoformas de hirudina naturales (las isoformas naturales se denominan todas "hirudina"). Una isoforma natural es, por ejemplo, Val-Val-hirudina o Ile-Thr-hirudina. Otras realizaciones de la invención usan una variante de una isoforma de hirudina natural. Una variante se deriva a partir de una isoforma de hirudina natural, pero contiene, por ejemplo, aminoácidos adicionales y/o deleciones de aminoácidos y/o cambios de aminoácidos comparado con la isoforma natural. Una

ES 2 272 696 T3

variante de hirudina puede contener segmentos de péptido alternantes de isoformas de hirudina natural y nuevos aminoácidos. Se conocen variantes de hirudina y se describen, por ejemplo, en el documento DE 3 430 556. Las variantes de hirudina están disponibles en el comercio en forma de proteínas (Calbiochem Biochemicals, N°. de Cat. 377-853, -950-960).

5 Con frecuencia, las proteínas de fusión que contienen hirudina muestran una solubilidad sorprendentemente buena en medio ácido, y esto conduce a distintas ventajas en cuanto a la preparación química de la proteína. En primer lugar, muchos componentes del sobrenadante son precipitados en dichas condiciones y, en segundo lugar, la mayor parte de peptidasas o proteasas son inactivas. Así, acidificando el caldo de fermentación al final de la operación esto hace
10 posible separar directamente las proteínas del sobrenadante no deseadas junto con las células huésped de la proteína de fusión y, en una etapa posterior, concentrar dicha proteína de fusión. Esto es, de la misma manera, un objeto de la invención.

15 Al final de la fermentación, el procedimiento de plegado aún no puede ser 100% completo. La adición de mercaptano o, por ejemplo, hidrocloreuro de cisteína puede completar el procedimiento. Esto es, de la misma manera, un objeto de la invención.

Los ejemplos siguientes describen la invención más detalladamente, sin ser restrictivos.

20 Ejemplo 1

Construcción de un casete de expresión que codifica una proteína de fusión hecha de Leu-hirudina (Refludan®)-Arg-mini-proinsulina

25 Los materiales de partida son los plásmidos pK152 (documento PCT/EP00/08537), pSW3 (documento EP 0 347781) y el derivado de plásmido de levadura recombinante que codifica para la interleuquina 2 bovina (Price *et al. Gene* 55,1987). El plásmido de levadura se distingue por llevar una secuencia líder del factor a en el control del promotor ADH2 de levadura. Esta secuencia es seguida de la secuencia de ADNc de la interleuquina 2 bovina que es unida vía un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción KpnI y que contiene, después de la manipulación,
30 un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI en el extremo 3' no traducido que es único en el vector. Así, la secuencia de ADNc puede ser eliminada fácilmente del plásmido vía la división KpnI/NcoI. Ya que han sido publicados buenos rendimientos de expresión, puede ser asumido que la secuencia de interleuquina 2 de 3' (como T) tiene un efecto estabilizante sobre el ARNm y así no tiene que ser sustituida por una secuencia terminadora específica de levadura. El plásmido pK152 lleva la secuencia de ADN que codifica para Leu-hirudina (Refludan) y el plásmido
35 pSW3 lleva la secuencia de ADN para la miniproinsulina. La secuencia génica que codifica para la hirudina-Lys Arg-mini-proinsulin primero se prepara mediante la tecnología PCR. Con este propósito, se preparan 4 cebadores con la ayuda del sistema de síntesis de ADN Expedite®:

40 i. hir_insfl (SEQ ID NO: 1, segmento de proteína codificada: SEQ ID NO: 2)

I P E E Y L Q Arg F V N Q H L C
45 5' - ATCCCTGAGGAATACCTTCAG CGA TTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3'
59 60 61 62 63 64 65 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

50 ii. hir_insrev1 (SEQ ID NO: 3)

55 5'- CCTCACAAGTG TTGGTTAACA AA TCG CT GAAGGTATTC CTCAGGGAT-3'

iii. hirf1 (SEQ ID NO: 4, segmento de proteína codificada: SEQ ID NO: 5)

L T Y T D C
60 5' - TTT'TTTTGGATCCTTTGGATAAAAGACTTACGTATACTGACTGCAC

65 iv. insnco1 rev (SEQ ID NO: 6)

5'- TTTTTCAT GGGTCGACTATCAG

ES 2 272 696 T3

El cebador hir_insf1 describe la unión entre codones para los aminoácidos terminales de hirudina (59-65) y la secuencia de insulina B1-B7 vía el enlazador Arg (codon en negrita). El cebador hir_insrev1 es 100% complementario a ello. El cebador hirf1 codifica para el principio del gen de hirudina ampliado al sitio de división Kpn1 como se describe en el documento EP 0 324712. El cebador insncoirev marca el extremo 3' de la miniproinsulina sintética de acuerdo con el documento EP-A 0 347 781.

Dos reacciones en cadena de la polimerasa estándar son llevados a cabo usando los pares de cebador hirf1/hir_insrev1 con el ADN del plásmido pK152 como plantilla e hir_insf1/insncoirev con el ADN del plásmido pSW3 como plantilla. Las reacciones son llevadas a cabo en 100 ml de tampón de PCR, en cada caso, 200 nmol de cebador, 1 ml de polimerasa y 100 ng de vector. La etapa 1 es una incubación de 2 minutos a 95°C.

Esto entonces se sigue de 25 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 55°C y 30" a 72°C. El último ciclo se sigue de una incubación a 72°C durante 3 minutos, y la reacción posteriormente se para. Ya que los cebadores hir_insevrk e hir_insfkr son 100% complementarios, los productos de ADN de los dos productos se sobrelapan de acuerdo con dicha secuencia de modo que en una tercera reacción, usando los productos de las dos primeras reacciones como plantillas y los cebadores hirf1 e insncoirev, un fragmento de ADN sea formado, que codifica para la hirudina y la miniproinsulina separada por Arg. El fragmento de PCR es digerido por las enzimas Kpn1 y Nco1 y luego, en una reacción con ligasa T4, se inserta en el vector p α ADH2 abierto por Kpn1/Nco1. En analogía con el ejemplo 7 del documento EP-A 0 347 781, células competentes de *E. coli* MM294 entonces se transforman con la mezcla de ligamiento. El ADN del plásmido entonces se aísla de dos clones para su caracterización mediante el análisis de la secuencia de ADN. Después de la confirmación de la secuencia de ADN insertada, el ADN de una preparación de plásmido se usa para transformar las células de la cepa de levadura de panadería Y79, de acuerdo con dicho ejemplo. Sin embargo, usando el vector p α ADH2, la introducción del vector se sigue seleccionando para la complementación de la mutación trp1-1, en contraste con dicho ejemplo. Para otro control, el ADN del plásmido se aísla de nuevo a partir de los transformantes de levadura y se analiza mediante análisis de restricción. El vector de expresión construido se denomina pADH2Hir_Ins. La expresión se lleva a cabo de acuerdo con el ejemplo 4. La proteína de fusión se encuentra en el sobrenadante.

Ejemplo 2

Construcción de un casete de expresión que codifica para una proteína de fusión hecha de Leu-hirudina (Refludan)-Gly Asn Ser Ala Arg-mini-proinsulina

El ejemplo muestra un modo para modificar el sitio de reconocimiento de tripsina entre el derivado de hirudina y miniproinsulina. La construcción se lleva a cabo de acuerdo con el ejemplo 1.

Dos nuevos oligonucleotidos son sintetizados:

Hir_insf (SEQ ID NO: 7, segmento de proteína codificada: SEQ ID NO: 8)

G N S A R F V N Q H L C

5' ATCCCTGAGGAATACCTTCAGGGAAATTCGGCACGATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG

3'

Hir₆₅

B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

Hir_insrev (SEQ ID NO: 9)

5' CCACACAAGTGTGGTTAACAAATCGTGCCGAATTTCCCTGAAGGTATTCCTCAGGGAT

B2 B1

Hir₆₅

Dos reacciones en cadena de la polimerasa son llevadas a cabo usando el par de cebadores hirf1/hir_insrev1 con ADN del plásmido pK152 como plantilla e hir_insf1/insncoirev con ADN del plásmido pSW3 como plantilla. En una tercera reacción, usando los productos de las dos primeras reacciones como plantillas y los cebadores hirf1 e insncoirev, se forma un fragmento de ADN, que codifica la hirudina y la miniproinsulina separada por el enlazador Gly Asn Ser Ala Arg. El producto de la PCR3 posteriormente se divide por Kpn1 y Nco1, se introduce en el vector p α ADH2 abierto de manera apropiada y se caracteriza de acuerdo con el ejemplo 1. El plásmido se denomina pADHH_GNSA_Ins. Las células se transforman con el ADN del plásmido. La expresión se lleva a cabo de acuerdo con el ejemplo 3. La proteína de fusión se encuentra en el sobrenadante.

ES 2 272 696 T3

Ejemplo 3

Expresión de los productos recombinantes en el sistema de levadura de panadería

5 La expresión se divide en dos fases. En primer lugar, un precultivo se cultiva en medio mínimo de levadura. El medio tiene la siguiente composición por litro:

6,7 g - base de nitrógeno de levadura (sin aminoácidos)

10 5,0 g - casaminoácidos (sin vitamina)

0,008% - adenina

0,008% - uracilo

15 2% - glucosa

El cultivo principal o de expresión es inoculado con una alícuota del precultivo.

20 El medio de cultivo principal contiene por litro:

10 g - extracto de levadura

25 20 g - peptona

0,008% - adenina

0,008% - uracilo

30 4% - glucosa

35 Usando el medio descrito, se lleva a cabo la expresión en un matraz agitado de la manera siguiente: 0,3 ml de un precultivo que ha sido cultivado de la noche a la mañana se diluyen con 80 ml de medio precalentado y se incuban con agitación fuerte a 30°C durante aprox. 24 h. En cada caso, 1 ml del cultivo producido de este modo se centrifuga entonces, después de la determinación de la densidad óptica, y, después de eliminar las células, el sobrenadante se liofiliza y se analiza mediante SDS-PAGE. El contenido de hirudina biológicamente activo se determina llevando a cabo un ensayo de inhibición de trombina. Un protocolo de fermentación alternativo proporciona las células que se eliminan por filtración o centrifugación cuidadosa. Al aislar la proteína de interés del medio, se proporcionan las células a partir del medio de cultivo principal recién preparado precalentado que contiene alcohol y no más del 0,5% de glucosa como fuentes de carbono, y así la fermentación se continúa sin interrupción. Esta etapa puede ser repetida hasta 5 veces.

45 Ejemplo 4

*Clonación y expresión de la proteína de fusión hirudina-Arg-mini-proinsulina en el sistema *P. pastoris**

50 La compañía Invitrogen® vende un kit de clonación y expresión para preparar proteínas recombinantes con la ayuda del sistema *P. pastoris*. Para esto, se proporciona un protocolo técnico detallado en cuanto a la preparación y la expresión subsecuente de un sistema de *P. pastoris* para la producción de una proteína recombinante deseada de modo que sólo la construcción del vector de expresión que codifica para la proteína deseada debe ser descrita cuando se sigan dichos protocolos. Se usa el kit de expresión de Pichia EasySelect® (Nº. de cat. K1740-01).

55 El vector pPICZαA es parte del kit. Abriendo el vector por las enzimas de restricción XhoI y SacII se hace posible añadir, similar al ejemplo 1, una proteína de interés a la secuencia líder del factor alfa y analizar la secreción en el sobrenadante. La clonación de la proteína de fusión requiere dos cebadores. El cebador pichia_H_If1 (SEQ ID NO: 10) tiene la secuencia:

60 5' - TTTTTTCTCGAGAAAAGA CTTACGTATACTGAC - 3'

XhoI

Hir₁ Hir₂ etc.

65

ES 2 272 696 T3

El cebador pichia_H_Irev2 (SEQ ID NO: 11) tiene la secuencia:

5' - TTTTTTGGCGCCGAATTCACACTATTAGTTACAGTAGTTTTCC - 3'

5

SacII EcoRI

A21

La plantilla usada es el ADN del plásmido pADH2Hir_Ins. Una PCR estándar con ambos cebadores produce un producto de ADN que contiene la secuencia hirudina-Arg-miniproinsulina ampliada en los sitios de integración XhoI y SacII. Si el producto del ADN se divide de manera apropiada y el fragmento se aísla, dicho fragmento puede ser insertado en el ADN del vector abierto en una reacción de DNA de ligasa T4. Como desviación del protocolo del fabricante, la cepa de *E. coli* MM294, descrita en el ejemplo 1, es transformada con la mezcla de ligamiento y las colonias recombinantes son rastreadas para la transformación con éxito sobre placas de selección de zeocina. El ADN del plásmido se aísla de nuevo de los clones y luego se caracteriza mediante el análisis de secuencia del ADN y de restricción. Usando el plásmido construido de este modo, un clon de expresión de *P. pastoris* para la producción de la proteína de fusión se prepara después, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5

20 *Ensayo de inhibición de trombina*

La concentración de hirudina se determina de acuerdo con el método de Griebach *et al.* (*Thrombosis Research* 37, págs. 347-350, 1985). Para este objetivo, las cantidades específicas de un estándar Repludan son incluidas en las medidas para establecer una curva de calibración a partir de la cual puede ser determinado directamente el rendimiento en mg/l. La actividad biológica es también una medida directa para el plegado correcto del componente de proinsulina de la proteína de fusión. De forma alternativa, es posible usar una digestión proteolítica de *S. aureus* y el análisis subsecuente en un sistema RP-HPLC para determinar la formación correcta de puentes S-S.

Ejemplo 6

30

Purificación de la proteína de fusión

Después de la terminación de la fermentación, el pH se ajusta a 2,5-3. En contraste con la mayor parte de otros polipéptidos encontrados en el sobrenadante debido a la lisis espontánea de células huésped o debido a la secreción, la proteína de fusión sorprendentemente no precipita a pH 2,5-3. El medio de cultivo por lo tanto se acidifica de manera apropiada y luego, después de la terminación de la precipitación, el precipitado y las células se eliminan por centrifugación o por microfiltración y se concentran. Posteriormente, el medio se ajusta a pH 6,8 y el contenido de proteína de fusión se determina en paralelo por la medida analítica de HPLC. La determinación se continúa añadiendo tripsina al sobrenadante de modo que la tripsina esté en aprox. 1 mg por 1-1,5 mg de proteína de fusión. Después de la incubación a temperatura ambiente durante aprox. 4 horas, se lleva a cabo la purificación por cromatografía de intercambio catiónico a pH 3,5 en presencia de 2-propanol. La elución se lleva a cabo en el tampón aplicando un gradiente de 0,15 a 0,45 M. La mono-Arg-insulina se eluye hasta aprox. 0,3 M. Después de la dilución 1:1, se precipita mono-Arg-insulina a partir de las fracciones que contienen insulina a aproximadamente pH 6,8 con la adición de una solución de ZnCl₂ de fuerza iónica del 10%. La insulina se filtra y luego se disuelve en Tris-HCl (pH 8,5) 0,05 M causando una solución de 2 mg/ml. Después se añade una cantidad de aproximadamente 1 unidad de carboxipeptidasa B por 100 ml de solución y la reacción se lleva a cabo con agitación suave. El pH entonces se ajusta a pH 5,5 con ácido cítrico, y se cristaliza insulina en presencia de ZnCl₂. Los cristales se eliminan, se disuelven y, después de la purificación por RP-HPLC, se purifica de nuevo la insulina por cristalización.

50 Ejemplo 7

Procesamiento de la proteína de fusión directamente en el medio de cultivo

Al final del período de expresión, el medio de cultivo se ajusta a pH 6,8 y después se añade tripsina con agitación de modo que sea conseguida una concentración final de 4-8 mg por litro. Después de la incubación durante aprox. 4 horas, el caldo de fermentación tratado de este modo se ajusta a pH 2,5-3. Después de 1-6 horas de precipitación, el pH se sube a 3,5, y la mono-Arg-insulina formada se purifica vía cromatografía de intercambio catiónico en presencia de 2-propanol del 30%. Se lleva a cabo la elución mediante un gradiente de sal de NaCl de 0,05-0,5 M. Las fracciones que contienen el producto se diluyen 1:1 con H₂O y luego se añade ZnCl₂, de modo que se forme una solución de ZnCl₂ de 0,1% de fuerza iónica. La mono-Arg-insulina precipita a aprox. pH 6,8 y se convierte por vía del ejemplo a la insulina de acuerdo con el ejemplo 6.

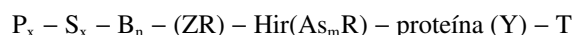
65

ES 2 272 696 T3

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN de la forma:

5



en la que:

10

P_x es cualquier secuencia de ADN promotora, seleccionada de tal modo que los rendimientos óptimos de la proteína de interés sean factibles;

15

S_x es cualquier ADN que codifique para una secuencia señal o secuencia líder que permita rendimientos óptimos;

B_n es 1-15 codones de aminoácido o un enlace químico;

Z es el codon de un aminoácido seleccionado a partir del grupo que comprende Lys y Arg;

20

R es un codon Arg o un enlace químico;

As_m es un enlace químico o codones de m aminoácidos, donde $m = 1-10$;

25

Hir es una secuencia de ADN que codifica para hirudina o un derivado de hirudina que es al menos 40% homóloga a la hirudina natural; en el que el derivado de hirudina puede exportarse a partir de levadura con buenos rendimientos similares a los de la hirudina,

Proteína Y es una secuencia de ADN que codifica para una mini-proinsulina; y

30

T es una secuencia de ADN no traducida que tiene un efecto estabilizante sobre el ARNm.

2. La proteína de fusión codificada por cualquiera de las moléculas de ADN de acuerdo con reivindicación 1.

35

3. El vector de multicopia que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.

4. El plásmido que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.

40

5. La célula huésped que comprende una molécula de ADN de la reivindicación 1, un vector de multicopia de la reivindicación 3 y/o un plásmido de la reivindicación 4, como una parte de su cromosoma, como una parte de un minicromosoma, o extra-cromosómicamente.

6. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha célula huésped es una levadura.

45

7. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6 seleccionada a partir del grupo que comprende *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*.

8. El procedimiento de fermentar una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, en el que:

50

(a) una molécula de ADN de la reivindicación 1, un vector de multicopia de la reivindicación 3, o un plásmido de la reivindicación 4 se expresa en una célula huésped de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 5 a 7, y

(b) la proteína de fusión expresada se aísla a partir del sobrenadante del cultivo celular.

55

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que después de la terminación de la fermentación, el pH se ajusta a 2,5-3,5 para precipitar proteínas no deseadas y la proteína de fusión expresada se aísla a partir del sobrenadante de la precipitación.

60

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en cuyo procedimiento después de separar el sobrenadante de fermentación de las células huésped, las células huésped son cultivadas repetidamente en medio recién preparado, y la proteína de fusión liberada se aísla de cada sobrenadante obtenido durante el cultivo.

65

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que una etapa del procedimiento para concentrar la proteína expresada en el sobrenadante después de la precipitación se selecciona a partir de un grupo que comprende microfiltración, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico.

ES 2 272 696 T3

12. El procedimiento para preparar insulina, en el que

(a) una proteína de fusión se expresa y se aísla de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 11;

5 (b) la proteína de fusión se trata con tripsina y carboxipeptidasa B; y

(c) la insulina se aísla a partir de la mezcla de reacción de la etapa (b).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 272 696 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Aventis Pharma Deutschland GmbH
- 5 <120> Uso de proteínas de fusión cuya parte del extremo N es un derivado de hirudina para la producción de proteínas recombinantes vía secreción mediante levaduras
- <130> DEAV2001/0008
- 10 <140> 10108211.8
<141> 2001-02-20
- 15 <160> 11
- <170> PatentInVer.2.1
- 20 <210> 1
<211> 47
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:hir_insf1
<400> 1
- 30 atccctgagg aatacctca gcgattgtt aaccaacact tgtgtgg 47
- <210> 2
- 35 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:proteina hir_insf1
- <400> 2
- 45 Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys
1 5 10 15
- 50 <210> 3
<211> 47
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hir_insf1
- 60 <400> 3
- cctcacaagt gttggtaac aaatcgctga aggtattcct cagggat 47
- 65 <210> 4
<211> 46
<212> DNA

ES 2 272 696 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: hirf1

<400> 4

10 ttttttggga tcctttggat aaaagactta cgtatactga ctgcac

46

<210> 5

<211> 6

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: proteina hirf1

<400> 5

25 Leu Thr Tyr Thr Asp Cys
1 5

<210> 6

30 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: insncolrev

<400> 6

40 tttttccat gggtcgacta tcag

24

<210> 7

45 <211> 59

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Hir_insf

<400> 7

55 atccctgagg aatacctca gggaaattcg gcacgatttg ttaaccaaca cttgtgtgg

59

<210> 8

60 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: proteina Hir_insf

ES 2 272 696 T3

<400> 8

5 Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys
1 5 10

<210> 9
<211> 59
10 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Hir_insrev

<400> 9

20 ccacacaagt gttggtaac aaatcgtgcc gaattccct gaaggattc ctcaggat 59

<210> 10
<211> 34
25 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: pichia_H_lf1

<400> 10

35 ttttttctc gagaaaagac ttacgtatac tgac 34

<210> 11
<211> 41
40 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: pichia_H_lrev2

<400> 11

50 tttttggcg ccgaattcac tattagttac agtagtttc c 41

55

60

65