República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012018956-5 B1

(22) Data do Depósito: 31/01/2011

(45) Data de Concessão: 31/05/2022

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA INTERFERON ALFA 5

(51) Int.Cl.: C12N 1/38; C12R 1/19.

(30) Prioridade Unionista: 01/02/2010 EP 10382019.7.

(73) Titular(es): DIGNA BIOTECH, S.L..

(72) Inventor(es): VLADAS ALGRIDAS BUMELIS.

(86) Pedido PCT: PCT ES2011070057 de 31/01/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/092367 de 04/08/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/07/2012

(57) Resumo: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA INTERFERON ALFA 5. É descrito um processo para produção de uma proteína interferon alfa 5 (INFa5) através da expressão em uma IFNa5 que produz célula hospedeira Escherichia Coli, em que incorporação de um resíduo de metionina extra na extremidade terminal-N da cadeia de polipeptídio é minimizada, como também a geração de suas espécies oxidadas. A proteína IFNa5 pode ser purificada através de um processo eficiente para render uma IFNa5 biologicamente ativa.

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA INTERFERON ALFA 5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um processo para produção de uma proteína interferon alfa 5 (IFNa5) através da expressão em uma IFNa5 que produz célula hospedeira *Escherichia coli*, em que a incorporação de um resíduo extra de metionina no final do terminal N da cadeia de polipeptídeo é minimizada, bem como a geração de suas espécies oxidadas. A proteína IFNa5 pode ser purificada através de um processo eficiente para render uma IFNa5 biologicamente ativa.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Interferons (INFs) são um grupo das glicoproteínas pleiotrópicas produzidas naturalmente, conhecidas como citocinas, secretadas a partir de diferentes tipos de células (células epiteliais, fibroblastos, linfócitos, macrófagos) pela indução de uma série de estímulos (vírus, bactérias, células, tumores e macromoléculas) e são dotadas de propriedades antivirais, anti-proliferativas e imuno-moduladoras, como também com uma ação analgésica. Após a sua produção endógena ou sua administração, a interferon interage com receptores específicos na superfície das células e inicia a transdução do sinal através do citoplasma até o núcleo, induzindo a expressão de genes que codificam para proteínas específicas que possuem atividade imuno-estimulante e antiviral. O potencial médico das IFNs tem sido reconhecido, conforme demonstrado pela aprovação de alguns tipos diferentes de IFNs para uso em humanos, tipos como IFN1a (Rebif, Avonex), IFN1b (Betaseron), como drogas para o tratamento de esclerose múltipla, e IFNa2a humana recombinante (Roferon A) e IFNa2b (Intron A), como drogas para o tratamento de (câncer) maligno e doenças virais.

Com base no tipo do receptor através do qual as IFNs sinalizam, IFNs humanas têm sido classificadas em três tipos majoritários, a saber, (i) IFN tipo I [todo tipo I de IFNs se liga a um complexo receptor de superfície de célula específica, conhecido como o receptor alfa IFN (IFNAR) –IFNs tipo I são, em humanos, IFN alfa (IFN-α) IFN beta (IFN-ß) e IFN ômega (IFN-ω)], (ii) IFN tipo II [IFN tipo II se liga a um receptor IFN gama (IFNGR) – IFN tipo II é, em humanos, IFN gama (IFN-ɣ)], e IFN tipo III [IFNs tipo III sinalizam através de um complexo receptor que consiste de IL10R2 e IFNLR1]. IFNs alfa e beta, conhecidos como IFNs tipo I, são estruturalmente correlacionados, estáveis em pH ácido e competem pelo mesmo receptor de célula (IFNAR).

No presente, IFNs alfa, beta e gama podem ser fabricados mediante forma recombinante com a dupla de vantagem de se conseguir quantidades muito maiores de produto, comparadas com aquelas obtidas através da isolação a partir de fontes naturais (leucócitos, fibroblastos, linfócitos), e de reduzir a complexidade do processo de purificação para verificar a segurança do produto. Na verdade, a maior parte do IFN recombinante comercializado farmaceuticamente é produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*.

O sistema de expressão de proteína recombinante *E. coli* tem sido, e ainda é, o sistema de escolha para a produção da IFN. De fato, genes IFN não possuem íntrons, e os produtos de proteína são geralmente não glicolisados. Além disso, *E. coli* pode crescer rapidamente até altas densidades celulares, e cepas usadas para produção de proteína recombinante têm sido modificadas geneticamente, na medida em que elas são geralmente consideradas como seguras para fermentação em larga escala.

A expressão de cDNA IFN foi realizada diretamente em E. coli, logo depois de ter sido clonada [Goedell et al. Nature, 287, 411-416, 1980;. Pestka, S. Arch. Biochem. Biophys, 221 (1), 1-37, 1983,. Mizoguchi et al. DNA., 4, 221-32, 1985;. Pestka et al. Ann. Rev. Biochem, 56, 727-777, 1987; Baron and Narula. Critical reviews in Biotechnology, 10 (3), 179-190, 1990]. De fato, o IFN alfa (IFNa) tem sido uma das primeiras proteínas a ser produzida por meio de *E. coli* com a tecnologia de DNA recombinante [Derynck et al, Nature, 287, 193-197, 1980, Nagata et al, Nature, 284, 316-320, 1980].

No entanto, a expressão de IFNs em *E. coli* mostra alguns problemas. IFNs expressas em larga quantidade em *E. coli* frequentemente se precipitam em agregados insolúveis, chamados corpos de inclusão (IBs) [Swaminathan et al., Prot Express. Purif., 15, 236-242, 1999; Bedarrain et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 33, 173-182, 2001; Srivasta et al. Prot. Express. Purif 41, 313-322, 2005] que são, de modo geral, proteínas falsamente redobradas e, portanto, biologicamente inativas [Villaverde and Carrio, Biotechnol. Lett., 25, 1385-1395, 2003]. Para obter tais proteínas sob a forma nativa é necessário submeter IBs a uma fase de desnaturação seguida por uma fase de renaturação, oxidação, no caso em que pontes de disulfeto devem ser formadas como na proteína natural. Além disso, a incorporação de um resíduo extra de metionina na extremidade terminal N da sequência de proteína alvo (por exemplo, uma IFN) é um aspecto característico da expressão de proteína em *E. coli*. Como é conhecido, resíduos

de metionina distribuídos dentro da sequência de uma proteína são propensos à oxidação.

Tais processos podem ocorrer durante o processo para produção de proteína ou da composição farmacêutica compreendendo tal proteína (caso ela possa ser usada como uma droga, por exemplo, uma IFN) e é mais nítida durante armazenamento de longo período a temperaturas elevadas.

Embora vários métodos de produção e purificação de IFNs em bactéria, como IBs, tenham sido desenvolvidos [por exemplo, Tatcher and Panayotatos, Methods Enzymol. 119, 166-177, 1986; US 4511502; US 4765903; US 4845032; EP 1310559; ou EP 1990349], existem outros fatores adicionais que podem apresentar obstáculos para a produção exitosa e purificação das IFNs, a saber, uma IFNa de grau terapêutico, tal como a incorporação de um resíduo extra de metionina no terminal N da IFN alvo e a geração de suas espécies oxidadas que devem ser removidas (caso o produto seja para uso como droga), removendo, assim, o rendimento global na produção de IFN, aumentando a complexidade do processo de purificação e tornando o processo de produção e purificação das IFNs alfa de grau terapêutico em um processo laborioso.

Por conseguinte, continua a existir uma necessidade de um método que permita a produção de IFNa, particularmente, IFNa5 de grau terapêutico a partir de células hospedeiras de *E. coli* de uma forma de alto rendimento e de custo eficaz.

RESUMO DA INVENÇÃO

Os inventores descobriram agora, surpreendentemente, que a concentração de microelementos (oligoelementos) no meio de fermentação tem um papel importante nas modificações pós-translacionais de IFNa5. Assim, controlando a concentração de microelementos no meio de fermentação, é possível minimizar a incorporação de um resíduo de metionina adicional na extremidade terminal N de uma IFNa5 produzida em uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*, bem como minimizar a geração de suas espécies oxidadas, o que aumenta o rendimento da produção e simplifica o processo de purificação, rendendo, assim, um processo para a produção e purificação de uma IFNa5, ou seja, uma IFNa5 de grau terapêutico, produzida em uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* em um processo menos complexo e mais barato em termos de custos.

Efetivamente, o Exemplo 4 mostra que a formação da forma da IFN alfa 5 (hIFNa5) de metionina humana oxidada é eliminada e que a quantidade das

formas de hIFNa5 acetilada é reduzida duas vezes (isto é, na metade), quando 1 litro (L) de solução de alimentação de carbono contém a partir de cerca de 3.0 mL até cerca de 3.7 mL de solução de estoque de microelementos, e, preferencialmente, que a taxa média de crescimento de cultura específica (μ), após indução, é igual ou maior do que 0.17.

Portanto, em um aspecto, a invenção se refere a um processo para produção de uma proteína interferon alfa 5 (IFNa5) por meio da expressão em uma IFNa5 que produz célula hospedeira *Escherichia coli*, o qual compreende:

a) prover uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*;

b) cultivar a IFNa5 que produz hospedeira *E. coli* sob condições efetivas para expressar tal proteína IFNa5 através de tal IFNa5 recombinante que produz célula hospedeira *E. coli* em um meio de fermentação, com a adição de uma solução de alimentação de carbono, em que

- tal meio de fermentação é livre de componentes de origem animal ou de origem em leveduras, e

- tal solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono e a partir de cerca de 3.0 até cerca de 3.7 mL de uma solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono adicionada; e

c) isolar e, opcionalmente, purificar a proteína IFNa5 expressa.

Em uma modalidade particular, tal célula hospedeira *E. coli* é uma cepa deficiente em protease *E. coli*, tal como a cepa hospedeira deficiente em protease *E. coli* $lon^-/ompT^-$, preferencialmente uma cepa de *E.coli* BL21, ainda mais preferencialmente uma cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

Em outra modalidade particular, quando a cepa *E. coli* é uma cepa *E. coli* BL21 (DE3), as condições da etapa b) compreendem indução com IPTG.

Em outra modalidade particular, a etapa c) de isolar e purificar a proteína IFNa5 expressa compreende, sucessivamente, após a lise das células hospedeiras *E. coli*, isolar tal proteína IFNa5 na forma de corpos de inclusão (IBs) ao sujeitar tais IBs à solubilização e a mistura resultante à uma renaturação de oxidação e a uma série progressiva de cromatografia compreendendo:

1) sujeitar tal mistura que compreende IFNa5 renaturada a uma cromatografia de interação hidrofóbica;

2) sujeitar a solução obtida na etapa 1) a uma cromatografia de troca de ânion;

3) sujeitar a solução obtida na etapa 2) a uma primeira cromatografia de troca de cátion; e

4) sujeitar a solução obtida na etapa 3) a uma segunda cromatografia de troca de cátion, em que tal solução é, opcionalmente, diluída com um tampão que compreende metionina,

a fim de obter uma IFNa purificada.

Em uma modalidade particular, tal IFNa5 é, preferencialmente, uma IFNa5 humana (hIFNa5).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o fluxograma de construção de uma cepa que produz IFNa5.

A figura 2 mostra os resultados das análises de restrição do DNA plasmídeo primário pET28-IFN alfa 5. Pistas 1-3 e 5-7: análises de restrição de pET28-IFN alfa 5; pistas 1 e 5: pET28-IFN alfa 5/BamHI; pistas 2 e 6: pET28-IFN alfa 5/NdeI; pistas 3 e 7: pET28-IFN alfa 5/NdeI+BamHI; pistas 4 e 8: pET28-IFN alfa 5, não clivadas. Tamanho de bandas de DNA marcador (Mistura de Condutor de DNA Regulador de Gen, Fermentas, Lituânia) é indicado em pares de quilobase (kbp).

A figura 3 mostra os resultados das análises de restrição de IFN alfa 5 de plasmídeo intermediário. O plasmídeo foi derivado a partir de um clone individual. Tamanho de bandas de DNA marcador (Mistura de Condutor de DNA Regulador de Gen, Fermentas, Lituânia) é indicado em kbp. Tamanhos de fragmentos esperados (em bp) são dados em parênteses. Pista 1: pUC57-IFN alfa 5/PstI (28; 3197); pista 2: pUC57-IFN alfa 5/PvuII (455; 406; 2364); pista 3: pUC57-IFN alfa 5/NdeI (250; 2975).

A figura 4 mostra a sequência de nucleotídeo completa do fragmento que codifica IFN alfa 5 (hIFNa5) humana, melhorada para expressão em *E. coli* pelo reposicionamento de alguns códons com os códons menos frequentemente usados em *E. coli*. Substituições de nucleotídeo são sublinhadas.

A figura 5 mostra os resultados de análises de restrição de plasmídeo pET-IFN alfa 5. O plasmídeo foi derivado a partir de clone individual. Tamanho de bandas de DNA marcador (Mistura de Condutor de DNA Regulador de Gen, Fermentas, Lituânia) é indicado em kbp. Tamanhos de fragmentos esperados (em bp) são dados em parênteses. Pista 1: pET21-IFN alfa 5/PagI (673; 817; 1008; 3423); pista 2: pET21-IFN alfa 5/PstI (1352; 4569); pista 3: pET21-IFN alfa 5/NdeI+BamHI (516; 5405).

A figura 6 mostra a expressão de proteína IFNa5 recombinante. A cultura de célula *E. coli* BL21 (DE3) pET21-IFN alfa 5 selecionada a partir de 9 colônias

(pistas 1-9) foram cultivadas em frascos de 750 mL (meio LB, volume 25 mL) à 37°C até OD_{600} DE CERCA DE 1.2. Expressão de proteína alvo induzida com 1 mM de IPTG por 2.5 horas. Amostras de proteínas de células totais foram executadas com Marcadores de Proteína BioRad (indicado em kDa à esquerda) em 15% de SDS-PAGE seguidas por coloração com azul de Coomassie.

A figura 7 mostra o fluxograma da biossíntese da hIFNa5 recombinante.

A figura 8 representa a pureza da hIFNa5 recombinante, processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por SDS-PAGE (14%), mediante tanto condições de redução (Figura 8A) e não redução (Figura 8b) da proteína hIFNa5 (a figura mostra os resultados de três grandes lotes de purificação de proteína hIFNa5).

A figura 9 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante, processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por "fase reversa – análise de cromatografia líquida de alto desempenho" (RP-HPLC) (a figura mostra os resultados de três grandes lotes de hIFNa5 recombinante).

A figura 10 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante, processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por análises de "exclusão de tamanho – HPLC" (SE-HPLC) (a figura mostras os resultados de três grandes lotes de hIFNa5 recombinante.

A figura 11 mostra a pureza de hIFNa5 recombinante, processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por análise de focagem isoelétrica (a figura mostra os resultados de três grandes lotes de hIFNa5 recombinante). Pistas 1, 11: padrão PI (Amersham Pharmacia); pistas 2, 3, 4; hIFNa5 recombinante, 15 µg; pistas 5, 6, 7: hIFNa5 recombinante, 5 µg; pistas 8, 9, 10: hIFNa5 recombinante, 1 µg.

A figura 12 mostra os cromatogramas que mapeiam peptídeos de três grandes lotes de preparações de hIFNa5 recombinante, purificados e formulados de acordo com esta invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

A fim de facilitar a compreensão da presente invenção, o sentido de alguns termos e expressões, conforme utilizadas no contexto da invenção, é provido pela presente descrição.

Conforme utilizado aqui, o termo "interferon alfa 5" (ou "IFN alfa 5" ou "IFNa") se refere a uma proteína produzida por leucócitos que aparentemente estão envolvidos principalmente com resposta imune inata contra infecção viral,

capaz de se ligar a um complexo receptor de superfície de célula específica, conhecido como receptor IFNa (IFNAR).

Proteínas IFNa5 são descritas, por exemplo, em WO 83/02459 (hIFNa5).

O termo "IFNa5" inclui proteínas que possuem (i) uma sequência de aminoácido que é pelo menos substancialmente idêntico à sequência de aminoácido de uma proteína IFNa5 nativa e (ii) uma atividade biológica que é comum a uma IFNa5 nativa. Sequência de aminoácido substancialmente idêntica significa que as sequências são idênticas ou diferentes em função de uma ou mais alterações de aminoácido (isto é, deleções, adições, substituições) que não produzem dissimilaridade funcional adversa entre proteína sintética e a IFNa5 nativa, por exemplo, proteínas IFNa5 que possuem pelo menos 70% de identidade com uma ou das proteínas IFNa5 citadas, X% de identidade entre uma proteína (P) IFNa5 e uma proteína IFNa5 de referência (R), significa que quando as duas sequências estão alinhadas, X% dos aminoácidos de P são idênticos ao aminoácido em sequência R, ou são substituídos por um aminoácido do mesmo grupo, tais como:

- Aminoácidos com grupos R não-polares: Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilanina, Triptofano, Metionina;
- Aminoácidos com grupos R polares não carregados: Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina;
- Aminoácidos com grupos R polares carregados (carregados negativamente em pH 6.0): Ácido aspártico, Ácido Glutâmico;
- Aminoácidos básicos (carregados positivamente em pH 6.0): Lisina, Arginina, Histidina (em pH 6.0);
- Aminoácidos que possuem grupos fenila: Fenilalanina, Triptofano, Tirosina.

Substituições conservativas particularmente preferidas são:

Lys por Arg e vice-versa, de tal modo que uma carga positiva possa ser mantida;

Glu por Asp e vice-versa, de tal modo que uma carga negativa possa ser mantida;

Ser por Thr, de tal modo que um OH livre possa ser mantido;

Gln por Asn, de tal modo que um NH2 livre possa ser mantido.

Esses percentuais de identidade de sequência podem ser obtidos pelo uso do programa BLAST (blast2seq, parâmetros por defeito) [Tatutsova and Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250 (1990)].

Conforme utilizado aqui, o termo "IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*" se refere a uma célula hospedeira *E. coli* que tem sido geneticamente desenvolvida para produzir uma proteína que possui atividade biológica associada com uma IFNa5. Em uma modalidade particular, a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa deficiente em protease *E. coli,* tal como a cepa hospedeira deficiente em protease *E. coli* $lon^-/ompT^-$, mais preferencialmente uma cepa de *E.coli* BL21, ainda mais preferencialmente uma cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

Conforme utilizado aqui, o termo "atividade biológica de uma IFNa5" se refere a qualquer atividade biológica de tal IFNa5 que inclui a atividade terapêutica de tal IFNa5. WO 83/02459 revela que a IFNa5 apresenta atividade antiviral contra vírus de RNA e DNA, atividade de crescimento celular e uma habilidade para regular a produção de enzimas intramoleculares e outras substâncias produzidas por célula; por conseguinte, espera-se que IFNa5 possa ser utilizada para tratar infecções virais (por exemplo, infecção por hepatite B crônica), tumores e câncer.

Conforme utilizado aqui, a expressão um meio de fermentação é "livre de componentes de origem animal ou de origem em levedura" significa que não há risco de transmitir agentes que causam Encefalopatia Espongiforme via produtos médicos, não há qualquer evidência de contaminação BSE ou casos de vCJD associado com produtos farmacêuticos. Produto é livre de quantidades de traços de proteínas contaminantes a partir de células de levedura.

Processo para produzir uma IFNa5

Em um aspecto, a invenção se refere a um processo para produção de uma proteína interferon alfa 5 (IFNa5) pela expressão em uma IFNa5 que produz célula hospedeira *Escherichia coli*, mas abaixo, o "processo da invenção", o qual compreende:

a) prover uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*;

b) cultivar a IFNa5 que produz hospedeira *E. coli* sob condições efetivas para expressar tal proteína IFNa5 através de tal IFNa5 recombinante que produz célula hospedeira *E. coli* em um meio de fermentação, com a adição de uma solução de alimentação de carbono, em que

- tal meio de fermentação é livre de componentes de origem animal ou de origem em leveduras, e

- tal solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono e a partir de cerca de 3.0 até cerca de 3.7 mL de uma solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono adicionada; e

c) isolar e, opcionalmente, purificar a proteína IFNa5 expressa.

A IFNa5 recombinante que pode ser produzida de acordo com o processo da invenção tem sido previamente definida. Em uma modalidade particular, tal IFNa5 recombinante que pode ser produzida de acordo com o processo da invenção é uma proteína IFNa5 que é substancialmente idêntica à IFNa5 nativa, isto é, uma proteína que é produzida por uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* que tem sido transformada com uma IFNa5 que codifica genes ou uma modificação desta que codifica uma proteína possuindo (1) uma sequência de aminoácido que é pelo menos substancialmente idêntica à sequência de aminoácido de uma IFNa5 nativa e (2) uma atividade biológica que é comum à IFNa5. Em uma modalidade preferencial, tal IFNa5 é hIFNa5.

Em uma modalidade mais particular, a IFNa5 recombinante, produzida de acordo com o processo da invenção, é uma IFNa5 que possui uma sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 1 (figura 4) que corresponde à IFNa5 madura que possui um resíduo extra de metionina na extremidade terminal N da cadeia de polipeptídeo.

De acordo com o processo da invenção, uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* é provida [etapa a)]. A princípio, no entanto, qualquer cepa de *E. coli* pode ser usada no processo da invenção, em uma modalidade preferencial, a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa deficiente em protease *E. coli* tal como a cepa hospedeira deficiente em protease *E. coli* $lon^-/ompT^-$, preferencialmente uma cepa de *E.coli* BL21, mais preferencialmente uma cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

A IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* pode ser obtida por métodos convencionais e protocolos para clonar e expressar uma IFNa5 [por exemplo, Sambrook et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second ed., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1-3 (Ausubel F.M. et al., ed.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994-1998]. Em uma modalidade particular, a clonagem e a expressão de uma IFNa5 que codifica genes e a construção da cepa bacteriana que produz proteína IFNa5 recombinante (isto é, a IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*) podem ser realizada de acordo com um método que compreende clonagem de um gene cDNA que codifica uma IFNa5, modificação da sequência de DNA de tal gene para melhorar sua expressão em *E. coli*, construção do plasmídeo de expressão, transformação do plasmídeo selecionado para uma cepa de *E. coli* adequada e

seleção das condições de expressão/indução. Exemplo 1 divulga a construção de uma IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli*.

Em uma modalidade particular, quando a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa deficiente em protease *E. coli*, tal como a cepa *E. coli* BL21 (DE3), tal célula hospedeira é transformada com um vetor que compreende uma sequência que codifica a proteína IFNa5 sob o controle de um promotor induzível; neste caso, a expressão da proteína requer a adição de um indutor, tal como, por exemplo, isopropil- ß-D-tiogalactopiranosideo (IPTG). Assim, de acordo com uma modalidade particular, quando a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa *E. coli* BL21, tal como uma cepa *E. coli* BL21 (DE3), as condições da etapa b) compreendem indução com IPTG.

Na etapa b) do processo da invenção, a IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* é cultivada sob condições efetivas para expressar tal proteína IFNa5 por meio da referida IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* em um meio de fermentação, com a adição de uma solução de alimentação de carbono, em que

- tal meio de fermentação é livre de componentes de origem animal ou de origem em leveduras, e

- tal solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono e a partir de cerca de 3.0 até cerca de 3.7 mL de uma solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono adicionada; e

As condições efetivas nas quais a IFNa5 que produz célula hospedeira *E. coli* deve ser cultivada para expressar tal proteína IFNa5 são, de modo geral, conhecidas pelas pessoas versadas na técnica. Tais condições incluem um meio de fermentação que compreende uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono e uma fonte de metais, adequados para que a célula hospedeira *E. coli* seja cultivada com a condição, de acordo com a presente invenção, de que o meio de fermentação esteja livre de componentes de origem animal ou de origem em leveduras, tais como um meio de fermentação químico sintético.

Em uma modalidade particular, fosfato dibásico de amônio e amônia, sozinhos ou em combinação, podem ser utilizados como uma fonte de nitrogênio. Em outra modalidade particular, a fonte de carbono pode ser ácido cítrico, glicose ou uma combinação destes.

O exemplo 2 descreve um meio de fermentação para cultivar uma IFNa5 que produz cepa *E. coli* BL21 (DE3), tal meio compreendendo fosfato dibásico de amônio, sulfato de magnésio, fosfato de dihidrogênio de potássio, ácido cítrico

glicose D(+) e uma solução de estoque de microelementos, em que a solução de estoque de microelementos compreende microelementos selecionados a partir do grupo de microelementos consistindo de ferro, cálcio, zinco, manganês, cobre, molibdênio, boro e combinações destes. Em uma modalidade particular, tal meio de fermentação compreende uma fonte de microelementos selecionados a partir do grupo de fontes de microelementos consistindo de cloreto de ferro (III), cloreto de cálcio, sulfato de zinco (II), sulfato de manganês (II), sulfato de cobre (II), cloreto de cobalto (II), molibdato de sódio, ácido bórico e suas combinações. Em uma modalidade particular, a solução de microelementos (oligoelementos) compreende (em g/L): cloreto de ferro hexa-hidratado (III) (30,0), cloreto de cálcio di-hidratado (4,05), sulfato de zinco hepta-hidratado (II) (6,75), mono-hidrato de sulfato de manganês (II) (1.5), penta-hidratado de cobre (II) (3,0), hexa-hidratado de cobalto (II) (1.14), di-hidrato de molibdato de sódio (0,3) e ácido bórico (0.69) [Exemplo 4].

Outro aspecto do processo da invenção se refere ao fato de que a solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono e a partir de cerca de 3.0 até cerca de 3.7 mL de uma solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono adicionada. As características de tal solução de microelementos têm sido previamente definidas. Em uma modalidade particular, a solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono (por exemplo, ácido cítrico e/ou glicose), sulfato de magnésio e, de acordo com a invenção, uma solução de microelementos encontrados em uma concentração de cerca de 3.0 mL até cerca de 3.7 mL de solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono a ser adicionada. Como mencionado acima, os Exemplos 2 e 4 divulgam uma solução de estoque de microelementos que compreende microelementos selecionados a partir de um grupo de microelementos consistindo de ferro, cálcio, zinco, manganês, cobre, cobalto, molibdênio, boro e combinações destes; em uma modalidade particular, tal solução de estoque de microelementos compreende cloreto de ferro (III), cloreto de cálcio, sulfato de zinco (II), sulfato de manganês (II), sulfato de cobre (II), cloreto de cobalto (II), molibdato de sódio, ácido bórico e combinações destes. Em uma modalidade particular, a solução de estoque de microelementos incluída em uma concentração de cerca de 3.0 mL até cerca de 3.7 mL de solução de microelementos por litro de solução de alimentação de carbono é a solução de estoque de microelementos divulgada nos Exemplos 2 e 4. O Exemplo 2 divulga o processo de biossíntese da IFNa5 por meio de uma cepa de produção.

Diferentes estudos realizados por inventores têm mostrado o efeito de microelementos modificações pós-translacional de IFNa5 recombinante (por exemplo, hIFNa5), a saber, que a quantidade relativa de Met oxidado encontrada em um PAI purificado de uma IFNa5 recombinante (por exemplo, hIFNa5 recombinante) produzida em *E. coli* está em relação muito próxima com a quantidade da "metionina não processada" na extremidade terminal N da cadeia de polipeptídeo. A fim de obter menos do que 10% de tal metionina não processada na extremidade terminal N, a quantidade de IFNa5 Met oxidada (determinada por RP-HPLC) após redobramento deve constituir não mais do que 1%.

Durante a melhoria do processo de biossíntese de hIFNa5 recombinante, os inventores observaram que a concentração de microelementos no meio de fermentação tinha um efeito importante nas modificações pós-translacionais da hIFNa5. De fato, foi determinado que a formação da forma hIFNa5 metionilada oxidada (hIFNa5 Met oxidada) é eliminada e a quantidade de formas hIFNa5 acetiladas é reduzida duas vezes (na metade), quando 1 L de solução de alimentação de carbono contém 3.0 mL – 3.7 mL de tal solução estoque de microelementos ou quando está dentro dos limites de 0.0048 mL/L/ o.u. – 0.0070 mL/L/o.u. [o.u.: unidades ópticas].

Em uma modalidade particular, o processo da invenção é realizado sob condições nas quais a média "taxa de crescimento de cultura específica" (μ), após indução, é igual a ou maior que 0.17 [μ: ((Em OD2 – Em OD1)/T2-T1), em que OD é "densidade óptica" (unidades ópticas, o.u.) e T é "tempo"]. Estudos realizados por inventores mostraram que crescimento de cultura e concentração de microelementos são intimamente interdependentes, especialmente quando a concentração de microelementos é muito baixa próxima do limite. Quando a concentração de microelementos no meio de cultura é menor do que 0.95 mL/L de volume de suspensão final (Exemplo 4, Tabela 3) ou menor do que 3.0 mL/L de solução de alimentação de carbono, a média μ após indução atinge apenas 0.121-0.158, isto é, menos do que 0.17 (M83, M-84, M-85, M-86). No entanto, quando a média μ após induções for menor do que 0.17, a presença de forma IFNa5 metionilada oxidada é praticamente garantida. Concentração de microelementos no meio de cultura maior do que 1.23 mL/L de volume de suspensão final resulta em crescimento mais rápido (M-89, M-90), maior WCW e maior quantidade de forma de IFNa5 acetilada + proteína desconhecida. No entanto, quando a média μ, após indução, é igual a ou maior do que 0.17, o

processo funciona melhor até a concentração de microelementos ser maior do que 0.123 mL/L de volume de suspensão final ou mais do que 3.7 mL/L de solução de alimentação de carbono.

Etapa c) do processo da invenção compreende isolar e opcionalmente purificar a proteína IFNa5 expressa. Em uma modalidade particular, após lise da IFNa5 que produz células hospedeiras *E. coli*, a proteína IFNa5 é isolada na forma de corpos de inclusão (IBs) ao se sujeita tais IBs à solubilização para render uma mistura contendo IFNa5 desnaturada que, por sua vez, é sujeita a um tratamento de renaturação que oxida para render uma mistura que compreende IFNa5 que é, então, sujeita a processo de purificação para obter a correspondente IFNa5 purificada. Em uma modalidade particular, tal IFNa5 é, preferencialmente, hIFNa5.

Para isolar e purificar a IFNa5 expressa de acordo com o processo da invenção, a IFNa5 que produz células hospedeiras *E. coli* é primeiramente rompida a fim de isolar tal IFNa5 recombinante na forma de corpos de inclusão (IBs). Resumidamente, em uma modalidade particular, as membranas da célula da IFNa5 que produz células hospedeiras *E. coli* são rompidas através da utilização de técnicas convencionais, tais como homogeneização, sonicação ou pressão cíclica. Métodos preferenciais incluem sonicação ou homogeneização com um homogeneizador de Poter (Teflon, vidro). Após as células terem sido rompidas, os IBs que contêm IFNa5 são separados da fase líquida do lisado, por exemplo, por centrifugação, e re-suspendidos em uma solução tampão apropriada. Os IBs podem ser opcionalmente lavados para que se removam quaisquer proteínas *E. coli* solúveis em água presentes neles.

Subsequentemente, tais IBs são solubilizados na presença de um agente de solubilização, tal como um agente caotrópico, por exemplo, uma proteína desnaturada que dissocia ligações de hidrogênio e afeta a estrutura secundária e terciária da proteína, causando seu redobramento, geralmente em uma solução de buffer aquosa, a fim de render uma mistura compreendendo IFNa5 desnaturada. De modo ilustrativo, não limitante, exemplos de agentes caotrópicos incluem uréia e hidrocloreto de guanidina (GdmHCl), preferencialmente hidrocloreto de guanidina, um forte agente caotrópico que previne carbamoilação da cadeia de polipeptídeo (o que pode ocorrer, caso solução concentrada de uréia seja utilizada). A concentração de agente caotrópico depende do agente caotrópico particular utilizado e da quantidade de material celular presente. Preferencialmente, uma solução de hidrocloreto de guanidina que possui uma

concentração de 6-7 M, mais preferencialmente 6 M, é empregada. O pH pode ser ajustado pela adição de tampões adequados, e, preferencialmente, o pH ficará acima de 7, tipicamente, igual a ou maior do que 8, preferencialmente, igual a ou maior do que 8.6, mais preferencialmente, entre 9.55 e 9.65, compreendendo um agente caotrópico. De modo geral, em uma modalidade preferencial, solubilização de IBs é realizada no mesmo pH, assim como para etapa de redobramento, evitando, assim, ajuste adicional de pH solubilizado para etapa de redobramento.

Após solubilização dos IBs contendo IFNa5, material particulado insolúvel é separado e descartado. IFNa5 desnaturada presente na mistura contendo IFNa5 desnaturada é renaturada através da diluição de tal mistura dentro de uma solução de renaturação, tal como um tampão de renaturação. Em uma modalidade particular, tal tampão de renaturação compreende um agente de labilização (por exemplo, L-arginina etc.) um par redox (por exemplo, GSH/GSSG etc.) e, opcionalmente, um composto quelante em um sistema de tampão possuindo um pH acima de 7.0, tipicamente, igual ou maior do que cerca de 8, preferencialmente, igual a ou maior do que 8.6, mais preferencialmente, entre 9.55 e 9.65. Após renaturação, a solução de proteína resultante contendo IFNa5 corretamente dobrada é clarificada através de técnicas convencionais, por exemplo, centrifugação ou filtragem, a fim de remover qualquer material particulado remanescente. Então, caso necessário, o Ph da solução de proteína clarificada é ajustado para 8.0-8.20, com um ácido adequado (por exemplo, HCl), e a mistura compreendendo IFNa5 renaturada (solução de proteína) é então sujeita a qualquer processo adequado para purificar a IFNa5.

Embora praticamente qualquer processo de purificação de IFNa5 possa ser utilizado, a invenção provê, adicionalmente, um processo eficiente para purificar uma IFNa5 que compreende sujeitar a IFNa5 renaturada a um processo de cromatografia em quatro etapas, compreendendo:

sujeitar tal mistura que compreende IFNa5 renaturada a uma cromatografia de interação hidrofóbica;

2) sujeitar a solução obtida na etapa 1) a uma cromatografia de troca de ânion;

3) sujeitar a solução obtida na etapa 2) a uma primeira cromatografia de troca de cátion; e

4) sujeitar a solução obtida na etapa 3) a uma segunda cromatografia de troca de cátion, em que tal solução é, opcionalmente, diluída com um tampão que compreende metionina.

Resumidamente, o pH ajustado, solução de proteína clarificada contendo um *pool* de proteína obtido após o tratamento de renaturação por oxidação ser aplicado, na etapa 1), para uma coluna de Fenil-sepharose, a fim de separar IFNa5 renaturada a partir de outros componentes, por exemplo, agentes caotrópicos residuais etc. Adicionalmente, o contato da IFNa5 renaturada com a superfície hidrofóbica do absorvente favorece a maturação da IFNa5.

Então, na etapa 2), o *pool* de proteína obtido na etapa 1) é ajustado para condutividade (por exemplo, 13.00-14.00 mS/cm), e o pH é ajustado para 8.75-8.85 e aplicado em uma coluna de Sepharose Q (cromatografia de troca de ânion), a fim de separar monômero de IFNa5 das suas formas agregadas. Frações que possuem uma pureza específica (por exemplo, igual a ou maior do que 55%) podem ser combinadas para purificações adicionais.

Subsequentemente, na etapa 3), o *pool* de proteína obtida na etapa 2) é ajustado para condutividade (por exemplo, 6.00-7.00 mS/cm) e o pH é ajustado para 5.15-5.20 e aplicado em uma coluna SP-Sepharose (primeira cromatografia de troca de cátion), a fim de separar a principal IFNa5 das isoformas carregadas, como a N-metionil-IFNa5 e IFNa5 acetilada (formas que são o produto de modificações pós-translacionais). Frações que possuem uma pureza específica (por exemplo, igual a ou maior do que 70%) podem ser agrupadas para purificação adicional.

Finalmente, na etapa 4), o *pool* de proteína obtido na etapa 3) é ajustado para condutividade (por exemplo, 6.00-7.00 mS/cm), e o pH é ajustado para 5.00-5.20 e aplicado em uma segunda coluna de SP-Sepharose (segunda cromatografia de troca de cátion), a fim de separar a forma de IFNa5 principal de isoformas carregadas. Em uma modalidade particular, L-metionina é adicionada à solução de carga a fim de prevenir oxidação de IFNa5 durante cromatografia realizada em temperatura ambiente. Frações podem ser agrupadas de tal forma que uma pureza de IFNa5 igual a ou maior do que ($\geq$) 95% (determinada por RP-HPLC) pode ser alcançada.

Se desejado, a IFNa5 obtida dessa forma pode ser formulada com veículos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, fosfato de sódio, pH 6.80-7.20, contendo cloreto de sódio. A solução de proteína, se desejado, pode ser concentrada acima da concentração desejada, por exemplo, em uma

modalidade particular, a solução de proteína é concentrada até 10 mg/mL, por exemplo, até 1.0-1.5 mg/mL de concentração de proteína, e tampão trocado por meio de ultra-filtragem e esterilizado pelo uso de filtragem estéril através de uma unidade de filtro estéril, com tamanho máximo de poro de 0.22 µm.

Exemplo 3 divulga um processo para isolar e purificar hIFNa5 de uma cepa que produz hIFNa5.

Os exemplos a seguir servem para ilustrar adicionalmente as modalidades da presente invenção.

EXEMPLO 1

Construção da cepa de *E. coli* que expressa IFNa5

Esse exemplo divulga o desenvolvimento e construção da cepa de *E. coli* que produz interferon alfa 5 humana recombinante (hIFNa5). Resumidamente, a clonagem e a expressão do gene hIFNa5 e a construção da cepa de bactéria que produz proteína IFNa5 recombinante foi conseguida, conforme descrito abaixo, por meio da utilização das seguintes etapas: clonagem do gene cDNA que codifica hIFNa5, modificação da sequência de DNA de tal gene para melhorar sua expressão em *E. coli*, construção do plasmídeo de expressão, transformação do plasmídeo selecionado em uma cepa de *E. coli* adequada e seleção das condições de expressão/indução.

Métodos

Métodos convencionais e protocolos foram utilizados na clonagem e expressão da hIFNa5 [Sambrook et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second ed., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1-3 (Ausubel F.M. et al., ed.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994-1998].

Todas as operações com enzimas, DNA e marcadores de proteínas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante [principalmente Fermentas (Lituânia)].

Construção Genética

A construção da IFNa5 que produz *E. coli* foi realizada de acordo com as seguintes etapas, mostradas no fluxograma do desenvolvimento das construções genéticas retratadas na Figura 1.

Plasmídeo Primário

A sequência que codifica IFNa5 (sem peptídeo de sinal) foi clonada a partir de tecido de fígado normal de um paciente doador anônimo – após consentimento informado – submetido à cirurgia abdominal em função de uma patologia não

relacionada com o fígado, como a seguir: tecido de fígado normal foi homogeneizado em 1 mL de solução Ultraspec (Biotex), e RNA total foi tratado com Dnase (Gibco-BRL, Paisleym U.K.), primeiramente para transcrição reversa com Transcriptase Reversa M-MLV (Gibco- BRL) na presença de Rnase OUT (Gibco- BRL). Sequência que codifica hIFNa5 (sem peptídeo de sinal) foi amplificada em PCR a partir do DNA complementar (cDNA) previamente obtido, utilizando-se os seguintes primers a montante e a jusante (5' – 3'):

GGAATTCCATATG**TGTGATCTGCCTCAGACCCA** (SEQ ID NO: 2), e

CGGGATCC**TTGAACCAGTTTTCATTCCTTC** (SEQ ID NO: 3).

Ambos os primers contêm sequência hIFNa5 (em ligação) e sequências específicas para as enzimas de restrição: NdeI e BamHI (sublinhadas). O produto PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose e a banda foi excisada do gel e purificada através do kit Gene Clean (MP Biomedicals). O produto PCR purificado foi clonado no plasmídeo TOPO pCR 2.1 utilizando-se o Kit Cloning TOTO TA (Invitogen). Clones da inserção foram seqüenciados em Genetic Analyzer ABIPRISM 310 (Perkin Elmer) utilizando-se o kit de sequenciamento de ciclo terminador Rhodamina tingida (Perkin Elmer) para verificar que a inserção corresponde exatamente à sequência hIFNa5. Depois disso, pCR 2.1 TOPO-IFNalfa5 foi digerida com as enzimas de restrição NdeI e BamHI, e a banda 534 pb (que corresponde à sequência que codifica IFNa5) foi clonada no vetor pET28b (Novagen) previamente digerida com as mesmas enzimas. A sequência foi novamente verificada através da utilização do mesmo procedimento.

Plasmídeo primário DNA pET28-IFN alfa 5 de diferente colônias foi analisado por meio de analises de restrição (Figura 2).

Plasmídeo pET28-IFN alfa 5 foi analisado por meio da sequência de ambos os filamentos de DNA utilizando-se uma analisador de sequência ABI Prisma 377. Essas análises confirmaram a sequência que codifica hIFNa5. Plasmídeo pET28-IFN alfa 5 foi utilizado para a construção da estrutura madura com otimização de códon como uma amostra para amplificação PCR.

Estrutura Madura com Otimização de Códon

Amplificação PCR do gene que codifica hIFNa5 incluindo otimização de códon

Amplificação PCR foi realizada por meio da utilização de plasmídeo pET28-IFN alfa 5 como amostra. Os seguintes oligonucleotídeos foram sintetizados:

Primer senso (SP): 5'- CAT ATG TGT GAT CTG CCG CAG ACC CAC TCC CTG TCT AAC CGT CGT ACT CTG ATG ATC ATG GCA CAG ATG GGT CGT ATC TCT CCT TTC [SEQ ID NO: 4]

Primer antisenso (ASP): 5'- CTG CAG TTA TTC CTT ACG ACG TAA ACG TTC TTG CAA G [SEQ ID NO: 5]

SP [SEQ ID NO: 4] e ASP [SEQ ID NO: 5] primers têm sido aplicados para substituir os códons que são pelo menos frequentemente utilizados em *E. coli*. Otimização de códon se refere, sobretudo, a códons de argina AGA e AGG.

Clonagem de fragmento PCR em plasmídeo intermediário

Os produtos de amplificação purificados de aproximadamente 500 bp, clonados em plasmídeo pUC57/T (#SD0171 Fermentas, Lituânia) utilizando Rapid DNA ligation Kit (#K1421, Fermentas, Lituânia) e transformados em *E. coli* JM109 (ATCC 53323, ATCC Bacteria and Bacteriophages, 19th edition, 1996). Clones recombinantes foram selecionados por meio de análises de restrição (Figura 3). Dois clones foram selecionados e os plasmídeos extraídos foram seqüenciados.

Análises de sequência de plasmídeo intermediário IFN alfa 5 e reclonagem de sequência que codifica IFN alfa 5 humana em plasmídeo pET21b (+)

As análises de sequência de nucleotídeo confirmaram a sequência de porção que codifica hIFNa5 e é mostrada na Figura 4.

O fragmento que codifica hIFNa5 foi NdeI+BamHI cortado, e fragmento de DNA purificado foi ligado ao NdeI+BamHI vetor de corte pET21b(+) (Novagen) para render o plasmídeo pET28-IFN alfa 5. Após transformação em cepa *E. coli* JM109, bactérias foram selecionadas por meio de adição de 100 µg/mL de ampicilina. Análise de inserção recombinante de colônias que resultam de células transformadas foi realizada utilizando-se método de teste de colônia PCR. Análise de restrição detalhada de plasmídeo pET28-IFN alfa 5, purificado a partir de clones positivos de PCR, resultou no padrão de restrição esperado (Figura 5).

Expressão de hIFNa5 recombinante

Após o plasmídeo pET28-IFN alfa 5 ter sido estabelecido (estabilizado) em uma hospedeira não expressa, ele foi transformado em uma hospedeira *E. coli* BL21 (DE3) contendo os elementos genéticos importantes para a expressão de proteínas alvo para processar a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pET21-IFN-5. A expressão de hIFNa5 foi induzida com IPTG 1 mM (isopropil-β-D-tiogalactopiranósido) e os resultados são mostrados na Figura 6.

De acordo com SDS-PAGE, o peso molecular da hIFNa5 é de cerca de 20 kDa, o qual correlata com o calculado 19.7 kDa.

A hIFNa5 recombinante foi detectada na fração insolúvel no lisado de célula total; o rendimento de proteína total foi de cerca de 20% da proteína de célula total. A hIFNa5 compreendia cerca de 40% da fração insolúvel do lisado de célula. Uma colônia da cepa de expressão obtida foi usada para o estabelecimento do banco de célula mestre de pesquisa (RMCB)

EXEMPLO 2

Processo de biossíntese da hIFNa5 por meio de uma cepa de produção

A cepa de *E.coli* BL21 (DE3) pET21-IFN a-5 (Exemplo 1) foi cultivada num meio com a seguinte composição (g/L):

a) para a preparação do inóculo (cultivo) nos frascos (g/L): di-hidrogeno-fosfato de sódio (17.0), di-hidrogenofosfato de potássio (1.82), sulfato de amônio (3.0), hepta-hidrato de sulfato de magnésio (0.5), D(+)-glicose mono-hidratada (15.0) e solução de estoque de microelementos e) (0,16 mL);

b) para a fermentação (g/L): fosfato de amônio dibásico (4.0), hepta-hidrato de sulfato de magnésio (0.5), di-hidrogenofosfato de potássio (13.3), ácido cítrico mono-hidratado (1.6), D (+)-glicose mono-hidratada (30.0) e solução de estoque de microelementos e) (0,25 mL);

c) solução de alimentação A (g/L): D(+) monohidrato de glucose (700.0), hepta-hidrato de sulfato de magnésio (20.7) e solução de estoque de microelementos e) (3.4 mL/L);

d) solução de alimentação B (g/L): fosfato de amônio dibásico (360.0) e di-hidrogenofosfato de potássio (306.7); e

e) solução de estoque (oligoelementos) de microelementos (g/L): cloreto de hexa-hidratado de ferro (III) (30.0), cloreto de cálcio di-hidratado (4.05), sulfato de zinco hepta-hidratado (II) (6.75), mono-hidrato de sulfato de manganês (II) (1.5), penta-hidratado de sulfato de cobre (II) hexa-hidratado de cloreto de cobalto (II) (1.14), di-hidrato de molibdato de sódio (0.3) e ácido bórico (0.69).

A Figura 7 mostra o esquema integral do processo de biossíntese da IFN alfa-5 humana.

Preparação do inoculo: Um frasco de Erlenmeyer contendo 500 mL de meio estéril para cultivo nos frascos [(a] foi inoculado com 0.25 mL de cultura de estoque de WCB (banco de célula de trabalho) *E. coli* BL21 (DE3) pET21-IFN a-5. Em seguida, o frasco foi incubado num agitador rotativo com agitação a velocidade de 300 rpm, a 30°C de temperatura por 21 a 22 horas. A densidade

óptica após incubação deve ser igual ou superior a 4.50 o.u. (unidades ópticas) [λ = 595 nm].

Fermentação: Um fermentador (13.7 L de volume total) contendo 7.0 L de meio de fermentação [b)], foi inoculado com 1,5-1,6% da cultura obtida no frasco de inóculo. A fermentação foi realizada à temperatura automaticamente controlada (37°C), pH (6,8) e pO_2 (20%). Solução de amônia 25% foi utilizada para a correção de pH. Após 8-9 horas de cultivo, a alimentação adicional foi iniciada. Solução de alimentação A [c)] foi bombeada em certas doses, a fim de manter a concentração de glicose no meio de cultiva entre cerca de 3 g/L e 22 g/L. A indução foi realizada com IPTG a 90-110 o.u. (λ = 595 nm) para fazer a concentração final de IPTG 0,5 mM. Taxa específica de crescimento da cultura no ponto de indução não deve ser inferior a 0,45, a fim de ter suficiente taxa de crescimento específico após a indução. Taxa média de crescimento específico da cultura após a indução deve ser superior a 0,17. Solução de alimentação B [d)] foi bombeada em doses separadas: 150 mL a 60-70 o.u., 150 mL a 120-140 o.u., 75 mL por 1,5 horas (90 minutos) e 75 mL por 2 horas após a indução. A fermentação foi continuada durante 3 horas após a indução nas mesmas condições. Em seguida, a suspensão de células foi arrefecida no fermentador a 12-15°C e transferida para uma centrífuga através de uma bomba peristáltica (35 L/h). A suspensão de células foi centrifugada a velocidade de 5000 rpm a 4°C.

A biomassa colhida foi recolhida num saco de polietileno e colocada em refrigerador (-33±5)°C para armazenamento e subsequente congelamento. Uma parte da biomassa congelada foi levada para a avaliação da expressão de proteínas totais e de hIFNa5.

EXEMPLO 3

Processo para isolar e purificar hIFNa5 a partir de cepa de produção

1. Homogeneização de biomassa, rompimento e isolamento de corpos de inclusão (Ibs)

680.0 – 700.0 g de biomassa obtida no Exemplo 2 foram homogeneizada em um buffer de ressuspensão (0.1 M Tris-HCl, pH 7.80-8.00, contendo 2 mM EDTA, 0.1% de TritonX-100 e 1 mM PMSF) a uma proporção de 1/10 (w/v), isto é, 1 g de biomassa úmida / 10 mL de tampão de ressuspensão.

Ressuspensão foi realizada em um homogeneizador de Poter (Teflon/vidro) e então as células foram rompidas com um homogeneizador de alta pressão a 600-800 bar a 4-10°C de temperatura. Após desintegração das células, corpos de

inclusão (Ibs) foram separados por meio de centrifugação a 8,000 rom entre 30 a 35 minutos.

2. Lavagem dos corpos de inclusão (IBs)

Pré-lavagem de IBs isolados foi realizada por um processo de quatro fases consecutivas com tampões de lavagem I-III:

Tampão de lavagem I: 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,45-7,55, contendo 1 M de NaCl, 0,1% de Polissorbato-80;

Tampão de lavagem II: 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,00-8,20, contendo ureia 6 M;

Tampão de lavagem III: 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,00-8,20.

Em resumo, a lavagem de IBs foi realizada como se segue:

a) as duas primeiras lavagens (etapas 1 e 2), os IBs foram lavados com tampão de lavagem I;

b) a terceira lavagem (etapa 3), os IBs foram lavados com tampão de lavagem II; e

c) a quarta lavagem (etapa 4), os IBs foram lavados com tampão de lavagem III.

A proporção de biomassa úmida / tampão de lavagem de 10 ml de tampão/1 g de biomassa úmida foi mantida durante todo o procedimento de lavagem dos IBs.

3. Solubilização de IBs

A fim de solubilizar oS IBs, um tampão de solubilização (50 mM de glicina / NaOH, pH 9,55-9,65, contendo 6 M GdmHCl) foi utilizado. Taxa de solubilização: IBs isolados a partir de 1 g de biomassa em 6 mL de tampão de solubilização durante 2h a 2-8°C, e na sequência de centrifugação a 8000 rpm durante 25-30 min.

4. renaturação

Tampão de renaturação: 50 mM de glicina / NaOH, pH 9,55-9,65, contendo 1,2 M NaCl, 0,22 de M L-arginina, 2,85 mM GSH, GSSG 0,285 mM, condutividade 110-110 mS / cm a 4-10oC.

GdmHCl desnaturado de IFN alfa 5 humana foi renaturado por adição gota a gota do solubilizado de IBs em tampão de renaturação (razão de volume 1:7) para obter uma concentração final na mistura de renaturação de 0,2 M L-arginina, 2.5/0.25 mM GSH / GSSG. Mistura de renaturação foi continuamente agitada durante 44-66 horas a 2-8°C. Após renaturação, a solução de proteína foi clarificada por centrifugação a 8000 rpm durante 30-35 min.

5. Cromatografia

hIFNa5 foi purificada por meio de um processo de cromatografia de quatro etapas, conforme mencionado abaixo.

5.1 Cromatografia através de uma coluna de Fenil-Sepharose (cromatografia de interação hidrofóbica)

A coluna de Fenil-Sepharose é destinada a hIFNa5 renaturada de separação a partir de agente caotrópico residual GdmHCl. Adicionalmente, o contato da hIFNa5 renaturada com a superfície hidrofóbica do absorvente favorece maturação da hIFNa5.

Resumidamente, o pH da solução de proteína clarificada foi ajustada a 8.00-8.20 com 6 M HCl e a solução de proteína foi então aplicada em uma coluna de Fenil-Sepharose de cromatografia com os seguintes parâmetros de processo:

Meio de cromatografia: Fluxo Rápido de Fenil-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB);

Coluna utilizada: BPG 100 X 500 mm, diâmetro de 10 cm;

Taxa de fluxo linear: 60 cm/hora

Volume de leito de meio de cromatografia: 2.7 ± 0.3 L

Tampão de equilíbrio: 20 mM tampão Tris-HCl, pH 8.00-8.20, contendo 1.5 M de cloreto de sódio, condutividade 115-125 mS/cm a 15-25°C (110-120 mS/cm a 4-10°C);

Tampão de eluição: 10 mM tampão Tris-HCl, pH 9.20-9.25, condutividade 0.1-02 mS/cm a 15-25°;

Eluição através 6 volumes de coluna (CV) [isto é, 6CV] com tampão de eluição é realizada. Solução de proteína coletada 2-6 CV.

5.2 Cromatografia através de uma coluna Q-Sepharose (cromatografia de troca de ânion)

A coluna Q-Sepharose é utilizada para separar monômero de hIFNa5 a partir de suas formas agregadas.

Resumidamente, o *pool* de proteína obtido na etapa anterior (5.1) foi ajustada para condutividade de 13.00-14.00 mS/cm por meio de adição de 20 mM tampão Tris-HCl, pH 8.75-8.85, contendo 5 M NaCl, e pH foi ajustado para 8.75-8.85 com 6 M HCl. A solução de proteína foi, então, aplicada em uma coluna de Q-Sepharose de cromatografia com os seguintes parâmetros:

Meio de cromatografia: Fluxo Rápido de Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB);

Coluna utilizada: BPG 140 X 500 mm, diâmetro de 14 cm;

Taxa de fluxo linear: 60 cm/hora

Volume de leito de meio de cromatografia: 3.3 ± 0.3 L

Tampão de equilíbrio: 20 mM tampão Tris-HCl, pH 8.75-8.85, contendo 0.12 M de cloreto de sódio, condutividade 13.00-14.00 mS/cm a 15-25°C;

Tampão de eluição: 20 mM tampão Tris-HCl, pH 8.75-8.85, contendo 0.23 mM de cloreto de sódio, condutividade 23.00-25.00 mS/cm a 15-25°C;

Eluição: gradiente linear para 100% de tampão de eluição através de 5 volumes de coluna (5CV) e 5CV de 100% de tampão de eluição.

Volume de fração foi de 400-1,000 mL.

Somente frações de pureza igual a ou maior que (≥) 55% de hIFNa5 (conforme demonstrado por RP-HPLC) foram agregadas para purificação adicional.

5.3 Primeira cromatografia através de uma coluna SP-Sepharose (cromatografia de troca de cátion I)

A coluna SP-Sepharose é utilizada para a terceira e quarta etapa de cromatografia, a fim de separar a forma hIFNa5 principal a partir das isoformas carregas como N-metionil-hIFNa5 e hIFNa5 acetilada (formas que são os produtos de modificações pós-translacionais).

Resumidamente, o *pool* de proteína obtido na etapa anterior (5.2) foi ajustado para condutividade de 6.00-7.00 mS/cm por meio da adição de 100 mM de tampão de acetato de sódio, pH 4.95-5.05, e o pH foi ajustado para 5.15-5.20 com 4 M de ácido acético. A solução de proteína foi, então, aplicada em uma coluna de SP-Sepharose de cromatografia com os seguintes parâmetros de processo:

Meio de cromatografia: Fluxo Rápido de SP-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB);

Coluna utilizada: BPG 100 X 500 mm, diâmetro de 10 cm;

Taxa de fluxo linear: 60 cm/hora

Volume de leito de meio de cromatografia: 3.3 ± 0.3 L

Tampão de equilíbrio: 20 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5.15-5.20, contendo 50 mM de cloreto de sódio, condutividade 6.00-7.00 mS/cm a 15-25°C;

Tampão de eluição: 20 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5.15-5.20, contendo 2 mM de L-metionina e 0.1 M de NaCl, condutividade 11.00-13.00 mS/cm a 15-25°C;

Eluição através de 10 volumes de coluna (10CV) com tampão de eluição foi realizada.

Volume de fração foi de 400-2,000 mL.

Somente frações de pureza igual a ou maior que (≥) 70% de hIFNa5 (conforme determinado por RP-HPLC) foram agregadas para purificação adicional.

5.4 Segunda cromatografia através de uma coluna de SP-Sepharose (cromatografia de troca de cátion II)

Resumidamente, a solução de carga [agregado de fração de proteína recuperada a partir da primeira coluna de SP-Sepharose (etapa 5.3)] foi diluída com 5 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5.00-5.20, contendo 2 mM L-metionina, condutividade de 0.200-0.800 mS/cm a 15-25°C para condutividade de 6.00-7.00 mS/cm a 15-25°C. Inclusão de 2 mM de L-metionina na solução de carga foi feita a fim de prevenir oxidação de hIFNa5 durante cromatografia realizada em temperatura ambiente. A solução de carga foi aplicada em uma coluna de SP-Sepharose de cromatografia com os seguintes parâmetros de processo:

Meio de cromatografia: Fluxo Rápido de Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB);

Coluna utilizada: BPG 100 X 500 mm, diâmetro de 10 cm;

Taxa de fluxo linear: 60 cm/hora

Volume de leito de meio de cromatografia: 3.0 ± 0.3 L

Tampão de equilíbrio: 20 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5.15-5.20, contendo 50 mM de cloreto de sódio, condutividade 6.00-7.00 mS/cm a 15-25°C;

Tampão de eluição: 20 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5.15-5.20, contendo 0.1 M de NaCl, condutividade 11.00-13.00 mS/cm a 15-25°C;

Taxa de fluxo linear de eluição: 45 cm/hora

Eluição: gradiente linear para 100% de tampão de eluição através de 20 volumes de coluna (20CV).

Volume de fração foi de 400-2,000 mL.

Frações foram agregadas de tal forma que pureza RP-HPLC da hIFNa5 é igual a ou maior que (≥) 95%.

Formulação, concentração, filtragem estéril

Tampão de formulação: 25 mM de fosfato de sódio, pH 6.80-7.20, contendo 0.1 M de cloreto de sódio, condutividade 10.00-14.00 mS/cm a 15-15°C.

A concentração/troca de tampão de solução de proteína foi realizada por meio de concentração/diafiltragem através de membrana 10 kDa Biomax igual a

ou maior que (≥) 1.00 mg/mL, filtrada de forma estéril através de um filtro estéril 0,22 µm (Millipak 20) e depositado em frascos de vidro.

A figura 8 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por SDS-PAGE (14%) mediante ambas as condições de redução e não redução de proteína hIFNa5 recombinante de três lotes de purificação de larga escala.

A Figura 9 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por meio de análise de "fase reversa – cromatografia líquida de alto desempenho" (RP-HPLC) (as figuras mostram os resultados de três lotes de larga escala de hIFNa5 recombinante).

A Figura 10 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por meio de análise de "exclusão de tamanho – HPLC" (SE-HPLC) para três lotes de larga escala hIFNa5 recombinante.

A Figura 11 mostra a pureza da hIFNa5 recombinante processada e formulada de acordo com esta invenção, conforme determinado por análises de foca isoelétrico para três lotes de larga escala de hIFNa5 recombinante. Pistas 1, 11: padrões PI (Amersham Pharmacia); pistas 2, 3, 4: hIFNa5 recombinante, 15 µg; pistas 5, 6, 7: hIFNa5 recombinante, 5 µg; pistas 8, 9, 10: hIFNa5 recombinante, 1µg.

A figura 12 representa os cromatogramas que mapeiam peptídeo de três lotes de larga escala de preparações de hIFNa5 purificada e formulada de acordo com esta invenção.

EXEMPLO 4

Avaliação de microelementos e efeito de concentração de glicose em biossínteses de IFN alfa 5 humana recombinante

O propósito deste exemplo era confirmar o efeito de microelementos em modificações pós-translacionais de IFN alfa 5 humana recombinante (hIFNa5), para determinar os limites de concentração crítica de microelementos na solução de alimentação de carbono e para avaliar o efeito da concentração de glicose na biossíntese de hIFNa5 recombinante. Assim, este exemplo descreve a análise realizada e os resultados obtidos durante o estudo e serve como justificativa da concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono e justificativa da concentração de glicose no processo de biossíntese de hIFNa5 recombinante.

Durante a otimização do processo de biossíntese da hIFNa5, foi detectado que a concentração de metais ou de microelementos (oligoelementos) no meio de fermentação tinha um efeito nas modificações pós-translacionais de proteína hIFNa5. Assim, o propósito deste estudo foi confirmar o efeito de tais oligoelementos nas modificações pós-translacionais na solução de alimentação de carbono. Adicionalmente a isso, decidiu-se avaliar a concentração de glicose (17 g/L e 22 g/L) no meio de fermentação após fornecimento de cada dose de alimentação de carbono, a fim de aprender se isso tinha qualquer efeito no crescimento da cultura (isto é, se isso envolve uma limitação de crescimento da cultura, afetando, assim, o rendimento de biomassa, ou se isso não tinha efeito no crescimento da cultura), como também na qualidade da proteína alvo (hIFNa5 recombinante).

Materiais e métodos

Tabela 1

Experimentos planejados e realizados

Lote Curto No.	Concentração de solução de microelementos na solução de alimentação de carbono, mL/L	Limite superior de concentração de glicose no meio de fermentação, g/L
M-83	2.2	17
M-84	2.2	22
M-85	2.7	17
M-86	2.7	22
M-87	3.7	17
M-88	3.7	22
M-89	4.2	17
M-90	4.2	22
M-92	3.2	22
M-80*; M-81*	3.0	22
M-82*	3.4	22
F-0030811*	4.0	22

Experimentos incluídos (*) que foram previamente realizados mediante as mesmas condições anteriores

Fermentações de lote alimentado de alta densidade celular foram realizadas em um meio de sal mineral/glicose definido quimicamente.

- Composição de meio de sal mineral/glicose para cultivo no frasco (g/L):

fosfato de hidrogênio di-sódio – 17.0, fosfato de dihidrogênio de potássio – 1.82, sulfato de amônio – 3.0, heptahidrato de sulfato de magnésio – 0.5, monohidrato de glicose D(+) – 15.0, solução de estoque de microelementos – 0.16 mL.

- Solução de estoque de microelementos (oligoelementos ou metais) (g/L): hexahidrato de cloreto de ferro (III) – 3.0, dihidrato de cloreto de cálcio – 4.05, heptahidrato de sulfato de zinco (II) – 6.75, monohidrato de sulfato de manganês (II) – 1.5, pentahidrato de sulfato de cobre (II) – 3.0, hexahidrato de cloreto de cobalto (II) – 1.14, dihidrato de molibdato de sódio – 0.3, ácido bórico – 0.69.

- Solução de alimentação de carbono: 70.0% de glicose, 2,1% de $MgSO_{4X}7H_2O$ e solução de estoque de microelementos de acordo com o plano experimental.

A concentração de glicose a partir a 8ª hora de cultivo foi medida a cada (15-30) min. e depois disso uma dose calculada (para atingir o limite superior de concentração de glicose de 17 g/L ou 22 g/L de acordo com o plano experimental) de fontes de carbono foi adicionada.

Além disso, 70 mL de ambas as soluções de fosfato (fosfato de amônio dibásico - 25,0 g, di-hidrogênio de fosfato de potássio - 21,0 g divididas em 3 doses: proporção de 2:2:1 ou 28:28:14 mL) em doses separadas, foram adicionadas a 60 - 75, 120-135 e 170-180 o.u.

Quando necessário, o ar de entrada foi automaticamente enriquecido com oxigênio puro (até 60% por litro de volume de fermentador total) para manter a concentração de oxigênio dissolvido a 20%.

0,25 mL de cultura de estoque de *E. coli* BL21 (DE3) pET21-IFN-5 a partir de uma WCB (armazenada a -70°C) [Exemplo 2] foram multiplicados em 500 mL do meio de sal mineral/glicose (pH em cerca de 7,7) incubados em um agitador orbital (300 rpm) durante 22 horas a 30°C.

Os inóculos foram de cerca de 1,0% (20 mL) do volume de fermentador de trabalho, que é de 1,54% do volume real.

As fermentações foram realizadas em um total de 3L / 2L de volume de fermentador de trabalho "Biostat B", a pH 6,8, pO_2 - 20%, temperatura de - 37°C. Processo de fermentação controlada automaticamente na linha de variáveis (temperatura, agitação, pH, pO_2, ácido/base de consumo) e variável off-line - densidade óptica traçada em parcelas MFCS/Win.

35% de ácido orto-fosfórico e 25% de solução de amônia a foram utilizados para a correção do pH.

Espuma foi extinta com 20% de Pluronic® 31R1.

A indução foi realizada a uma OD de 91,6 - 103,6 o.u. (λ = 600 nm) com IPTG para tornar a concentração final de IPTG de 0,5 mM para o volume de trabalho final. Fermentação continuou durante outras 3 horas.

Taxa de crescimento específico de cultura (μ), (alimentação adicional) de entrada e saída e (a amostragem para medição de OD e glicose) volumes foram estritamente calculados todos através de fermentações.

Resultados e análises de dados

As análises realizadas e os resultados obtidos durante este estudo garantem que modificações pós-translacionais de proteína hIFNa5 recombinante produzida em *E. coli* dependem da concentração de microelementos no meio de cultivo.

A proteína relacionada hIFNa5 metionilada oxidada foi eliminada quando a concentração de microelementos (solução de estoque) era igual ou maior que 3.0 mL/L de solução de alimentação de carbono ou igual a ou maior que 0.95 mL/L de volume de suspensão final real, e a taxa média de crescimento de cultura específica (μ) após indução foi igual a ou maior do que (≥) 0.17 (Tabelas 2-3).

Tabela 2

Parâmetros de biossíntese em diferentes concentrações de microelementos em solução de alimentação de carbono

Lote Curto No.	Frasco OD (600 nm)	Solução de Est. de Microelementos (mL/L alimentação de carbono)	Limite superior de glicose (g/L)	Fermentação					Total de proteínas (mg/g biomassa)	% de expressão de hIFNa5 a partir do total de proteínas
				Tempo decorrido antes da indução (h)	OD (600 nm)		WCW (g/L)	DCW (%)		
					No ponto de indução	No fim da fermentação				
M-83	5.1	2.2	17	11.25	94.6	136.2	169.1	30.12	115.00	18.95
M-84	4.9	2.2	22	11.25	91.8	139.2	161.4	31.89	98.33	18.95
M-85	5.6	2.7	17	11.75	95.8	149.3	158.5	30.98	101.33	17.95
M-86	5.4	2.7	22	11.50	91.6	147.0	170.7	30.26	113.33	17.35
M-80	5.3	3.0	22	11.75	103.6*	180.6*	175.4	32.11	120.33	18.53
M-81	5.2	3.0	22	11.00	96.8*	184.0*	185.9	33.47	122.20	18.47
M-92	4.8	3.2	22	11.50	103.6	172.5	188.3	30.31	112.00	20.00
M-82	5.5	3.4	22	11.50	99.5*	184.6*	178.8	32.08	116.00	18.13
M-87	4.5	3.7	17	11.75	99.6	179.0	183.4	30.82	114.33	18.75
M-88	5.0	3.7	22	11.75	96.0	158.5	175.3	30.49	116.33	18.40
M-89	4.8	4.2	17	13.00	92.4	173.5	182.4	31.09	126.70	21.45
M-90	4.5	4.2	22	11.75	98.8	178.0	194.1	30.67	151.00	20.95

* Em lotes realizados anteriormente, OD medido com Biofotômetro (Eppendorf, Á=595 nm), outro – com Espectômetro EZ 150 (PerkinElmer, A=600 nm); WCW: peso de célula úmida (g/L suspensão de célula); DCW: peso de célula seca (%)

Tabela 3

Biossíntese e parâmetros de redobramento em diferentes concentrações de microelementos

Lote curto No.	μ		Solução de estoque de microelementos (mL/L aliment. carbono	Total de micro-elementos (mL/L/o.u.) (final)	Total de micro-elementos (mL/L susp.) (de ac. com vol. final.)	hIFNa5 mg/mL 6M GdHCl	% RP-HPLC após redobramento			
	No ponto de indução	Média após indução					OxidMet hIFNa5	hIFNa5 corretamente redobrado	hIFNa5 acetilada	
									Pico-1	Pico-2
M-83	0.470	0.121	2.2	0.00581	0.790	1.84	12.60	50.35	3.02	4.08
M-84	0.457	0.139	2.2	0.00559	0.778	1.74	14.44	46.67	3.08	**4.15**
M-85	0.350	0.148	2.7	0.00627	0.935	1.95	15.48	41.10	2.93	4.38
M-86	0.427	0.158	2.7	0.00639	0.939	1.85	5.61	52.65	3.33	4.63
M-80	0.563	0.185	3.0	0.00543	0.980	2.52	0	62.01	4.08	5.07
M-81	0.578	0.214	3.0	0.00498	0.950	2.53	0	60.63	4.2	**4.56**
M-92	0.497	0.170	3.2	0.00641	1.105	2.26	0	66.58	4.07	5.45
M-82	0.452	0.194	3.4	0.00591	1.130	2.34	0	59.98	4.53	5.0
M-87	0.433	0.181	3.7	0.00687	1.229	2.02	0	63.04	5.22	5.52
M-88	0.575	**0.163**	3.7	0.00745	1.166	1.78	1.43**	63.15	2.61	3.47
F-0030811*	0,498	0,180	4.0	NT	NT	NT	0	48.36	7.75	7.11 ***
M-89	0.466	0.21	4.2	0.00787	1.365	1.82	0	54.06	7.25	5.99***
M-90	0.522	0.196	4.2	0.00788	1.403	1.68	0	55.57	7.66	5.94***

* 10 L (volume de trabalho) de fermentação; ** - taxa de crescimento mais lenta após indução (diluição, em função do sensor anti-espuma, foi fora do padrão, 84 mL de solução anti-espuma foi adicionada) *** - formação de forma adicional (desconhecida) é observada entre o pico principal e dois picos de formas acetiladas. NT: não testada

Conforme descrito aqui, a Tabela 2 mostra os parâmetros de biossíntese em diferentes concentrações de microelementos na solução de alimentação de carbono, ao passo que a Tabela 3 mostra a biossíntese em parâmetros de redobramento em diferentes concentrações de microelementos.

Um número de estudos tem sido realizado, tal como (i) a dependência de taxa de crescimento de cultura específica (μ) a partir da concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono ou na suspensão de célula; (ii) a dependência de hIFNa5 metionilada oxidada (OxidMet hIFNa5) após redobramento e hIFNa5 acetilada total após redobramento a partir da taxa média de crescimento de cultura específica (μ) após indução; (iii) a dependência de modificações pós-translacionais de proteína hIFNa5 (OxidMet hIFNa5 após redobramento, hIFNa5 acetilada após redobramento e hIFNa5 corretamente dobrada após redobramento) a partir da concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono; e (iv) a dependência de formas relacionadas

de hIFNa5 (hIFNa5 acetilada após redobramento e OxidMet hIFNa5 após redobramento) a partir da concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono ou na suspensão de célula. Adicionalmente, todos os lotes foram sujeitos a RP-HPLC após redobramento. A partir daqueles resultados, é evidente que taxa de crescimento de cultura específica (μ) e rendimento de biomassa dependem da concentração de microelementos no meio de cultivo (Tabelas 2-3).

Resumidamente, os resultados obtidos mostram que:

- o mais baixo conteúdo de hIFNa5 acetilada é observado nas quantidades mais altas de hIFNa5 metionilada oxidada e vice-versa (lotes curtos No. M-83, M-84, M-85 e M-86);
- a quantidade de hIFNa5 acetilada é de cerca de 8-11% quando a concentração de microelementos (soluções estoque) fica dentro dos limites de 3.0-3.7 mL/L de solução de alimentação de carbono (lotes curtos No. M-80, M-81, M-92, M-82 e M-87) ou dentro de limites de 0.95-1.23 mL/L de volume de suspensão final real (Tabela 3); e
- quando a concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono é maior do que 4 mL/L ou maior do que 1.23 mL/L de volume real de suspensão de célula final, uma forma adicional desconhecida (não identificada) foi detectada [isso é observado após o pico principal e dois picos de formas acetiladas (dados não mostrados)].

Os resultados obtidos também mostram que o limite superior (17 g/L ou 22 g/L) de concentração de glicose praticamente não afeta na qualidade da proteína alvo (hIFNa5) e no rendimento de biomassa, valores reais obtidos ficaram nos limites do erro (Tabela 2).

Conclusões

- Resultados obtidos durante este estudo servem como justificativa da concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono e a concentração de glicose no processo de biossíntese de hIFNa5 recombinante.
- Proteína hIFNa5 metionilada oxidada é eliminada quando a concentração de microelementos é igual a ou maior do que 3.0 mL/L de solução de alimentação de carbono, ou maior do que 0.95 mL/L de volume real de suspensão final e a taxa média de crescimento de cultura específica (μ) após indução é igual a ou maior do que 0.17.

- Proteína hIFNa5 acetilada fica em cerca de 8-11% quando a concentração de microelementos fica dentro de limites em torno de 3.0 mL/L de volume real de suspensão final.

- Quando a concentração de microelementos na solução de alimentação de carbono é maior do que 3.7 mL/L ou é maior do que 1.23 mL/L de volume real de suspensão final, uma forma de proteína desconhecida (não identificada) é sintetizada.

- Concentração ideal de microelementos que determinam rendimento máximo e a melhor qualidade de proteína hIFNa5 alvo fica dentro de limites de cerca de 3.0 a cerca de 3.7 mL/L de solução de alimentação de carbono.

- A concentração de glicose na variação a partir de 17 g/L a 22 g/L praticamente não afeta a qualidade da proteína alvo (hIFNa5 recombinante) e rendimento de biomassa.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de uma proteína interferon alfa 5 (IFNa5) através da expressão em uma célula hospedeira *Escherichia* coli, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) prover uma célula hospedeira *E. coli* que produz IFNa5;

b) cultivar a *E. coli* hospedeira que produz IFNa5 sob condições efetivas para expressar a referida proteína IFNa5 através da referida célula hospedeira *E. coli* que produz IFNa5 recombinante em um meio de fermentação, com a adição de uma solução de alimentação de carbono, em que:

- o referido meio de fermentação é livre de componentes de origem animal ou de origem em leveduras, e

- a referida solução de alimentação de carbono compreende uma fonte de carbono e a partir de 90 até 111 mg de hexahidrato de cloreto de ferro (III), a partir de 12,15 até 14,985 mg de dehidrato de cloreto de cálcio, a partir de 20,25 até 24,975 mg de heptahidrato de sulfato de zinco (II), a partir de 4,5 até 5,55 mg de monohidrato de sulfato de manganês (II), a partir de 9 até 11,1 mg de pentahidrato de sulfato de cobre (II), a partir de 3,42 até 4,218 mg de hexahidrato de cloreto de cobalto (II), a partir de 0,9 até 1,11 mg de dehidrato de molibdato de sódio e a partir de 2,07 até 2,553 mg de ácido bórico por litro de solução de alimentação de carbono adicionada; e

c) isolar e, opcionalmente, purificar a proteína IFNa5 expressa, em que a referida adição de solução de alimentação de carbono resulta em uma concentração de a partir de 28,5 até 36,9 mg de hexahidrato de cloreto de ferro (III), a partir de 3,8475 até 4,9815 mg de dehidrato de cloreto de cálcio, a partir de 6,4125 até 8,3025 mg de heptahidrato de sulfato de zinco (II), a partir de 1,425 até 1,845 mg de monohidrato de sulfato de manganês (II), a partir de 2,85 até 3,69 mg de pentahidrato de sulfato de cobre (II), a partir de 1,083 até 1,4022 mg de hexahidrato de cloreto de cobalto (II), a partir de 0,285 até 0,369 mg de dehidrato de molibdato de sódio e a partir de 0,6555 até 0,8487 mg de ácido bórico por litro do referido meio de fermentação.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a célula hospedeira *E. coli* é transformada com um vetor que compreende uma sequência que codifica uma proteína IFNa5 sob o controle de um promotor indutível.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa *E. coli* deficiente em protease.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa *E. coli* hospedeira deficiente em protease $Ion^-/ompT^-$.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a cepa hospedeira deficiente em protease *E. coli* $Ion^-/ompT$ é uma cepa de *E.coli* BL21.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a célula hospedeira *E. coli* é uma cepa de *E. coli* BL21 (DE3) e as condições da etapa b) compreendem indução com isopropil-β-D- tiogalactopiranosida (IPTG).

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a taxa média de crescimento de cultura específico (μ), após indução, é igual a ou maior do que 0,17.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade de IFNa5 com Met oxidada, após redobramento, é de 1% ou menor.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a referida proteína IFNa5 é hIFNa5.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína IFNa5 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína IFNa5 é isolada e purificada a partir de uma mistura que compreende a referida proteína IFNa5 na forma de corpos de inclusão (IBs) ao sujeitar tais IBs a solubilização para render uma mistura que contém IFNa5 desnaturada, a qual é, posteriormente, sujeita a um tratamento de renaturação oxidante para render uma mistura que compreende IFNa5 renaturada, e sujeitar a referida mistura que compreende IFNa5 a um processo de purificação a fim de obter a IFNa5 purificada.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a mistura que compreende IFNa5 renaturada é purificada ao se sujeitar a referida mistura a um tratamento de cromatografia em 4 etapas que compreende:

1) sujeitar a referida mistura que compreende IFNa5 renaturada a uma cromatografia de interação hidrofóbica;

2) sujeitar a solução obtida na etapa 1) a uma cromatografia de troca de ânion;

3) sujeitar a solução obtida na etapa 2) a uma primeira cromatografia de troca de cátion; e

4) sujeitar a solução obtida na etapa 3) a uma segunda cromatografia de troca de cátion, em que a referida solução é, opcionalmente, diluída com um tampão que compreende metionina.

Estrutura madura com Otimização de Códon

Amplificação PCR do fragmento de DNA que codifica IFN alfa 5

↓

Ligação de fragmento de DNA em plasmídeo intermediário

↓

Confirmação da sequência de nucleotídeo

↓

Subclonagem em vetor pET21b(+)

↓

Transformação para cepa de *E. coli* BL21(DE3)

↓

Confirmação da estrutura de plasmídeo por meio de análise de restrição

↓

Estabelecimento dos clones que produzem IFN alfa 5

Fig. 1

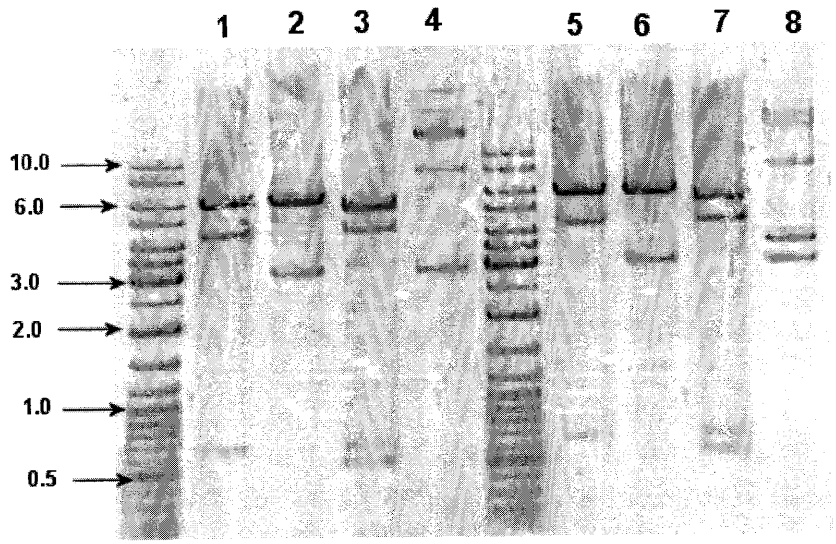


FIG. 2

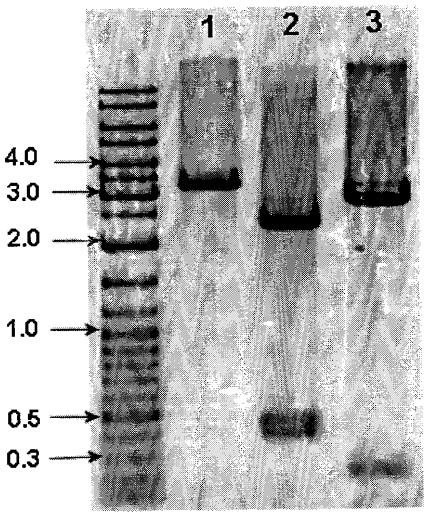


Fig. 3

```
1     atg tgt gat ctg ccg cag acc cac tcc ctg tct aac cgt cgt act ctg atg atc atg gca
        M   C   D   L   P   Q   T   H   S   L   S   N   R   R   T   L   M   I   M   A
61    cag atg ggt cgt atc tct cct ttc tcc tgc ctg aag gac aga cat gac ttt gga ttt cct
        Q   M   G   R   I   S   P   F   S   C   L   K   D   R   H   D   F   G   F   P
121   cag gag gag ttt gat ggc aac cag ttc cag aag gct caa gcc atc tct gtc ctc cat gag
        Q   E   E   F   D   G   N   Q   F   Q   K   A   Q   A   I   S   V   L   H   E
181   atg atc cag cag acc ttc aat ctc ttc agc aca aag gac tca tct gct act tgg gat gag
        M   I   Q   Q   T   F   N   L   F   S   T   K   D   S   S   A   T   W   D   E
241   aca ctt cta gac aaa ttc tac act gaa ctt tac cag cag ctg aat gac ctg gaa gcc tgt
        T   L   L   D   K   F   Y   T   E   L   Y   Q   Q   L   N   D   L   E   A   C
301   atg atg cag gag gtt gga gtg gaa gac act cct ctg atg aat gtg gac tct atc ctg act
        M   M   Q   E   V   G   V   E   D   T   P   L   M   N   V   D   S   I   L   T
361   gtg aga aaa tac ttt caa aga atc act ctc tat ctg aca gag aag aaa tac agc cct tgt
        V   R   K   Y   F   Q   R   I   T   L   Y   L   T   E   K   K   Y   S   P   C
421   gca tgg gag gtt gtc aga gca gaa atc atg aga tcc ttc tct tta tca gca aac ttg caa
        A   W   E   V   V   R   A   E   I   M   R   S   F   S   L   S   A   N   L   Q
481   gaa cgt tta cgt cgt aag gaa taa 504
        E   R   L   R   R   K   E   -
```

Fig. 4

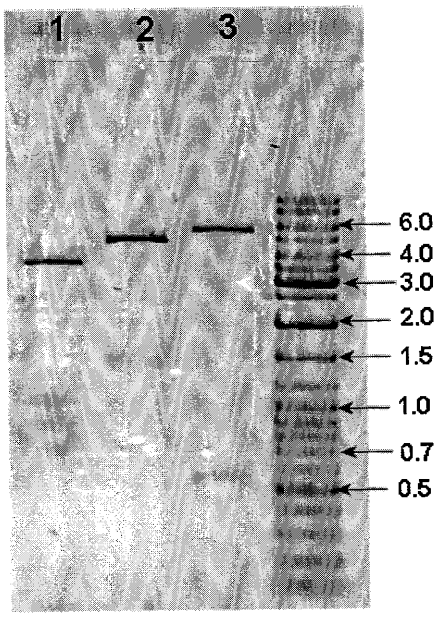


Fig. 5

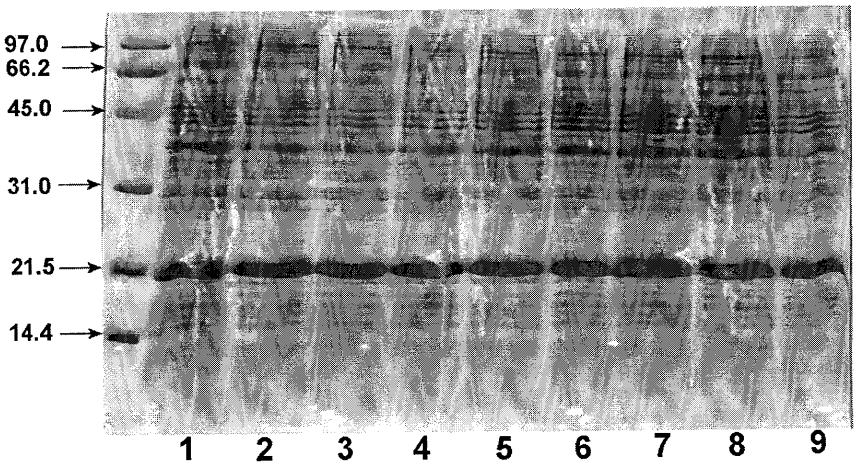


Fig. 6

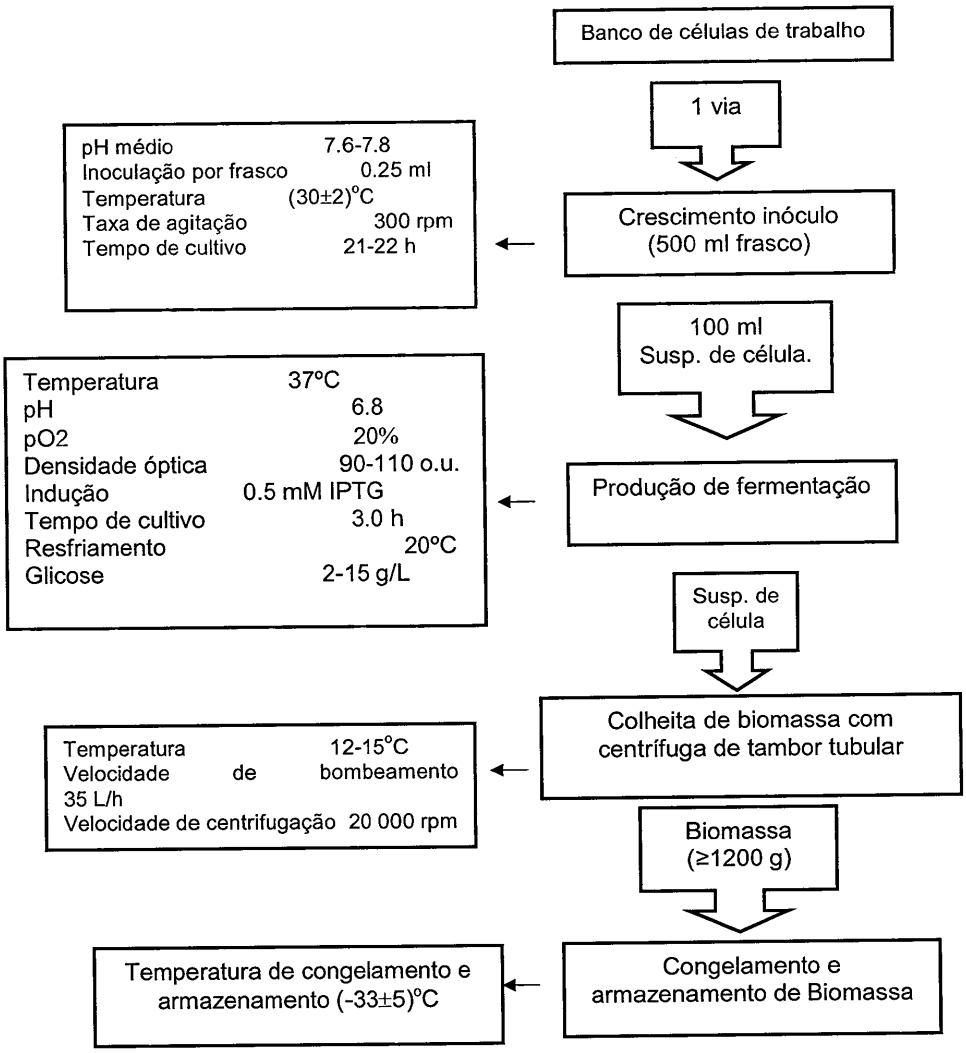
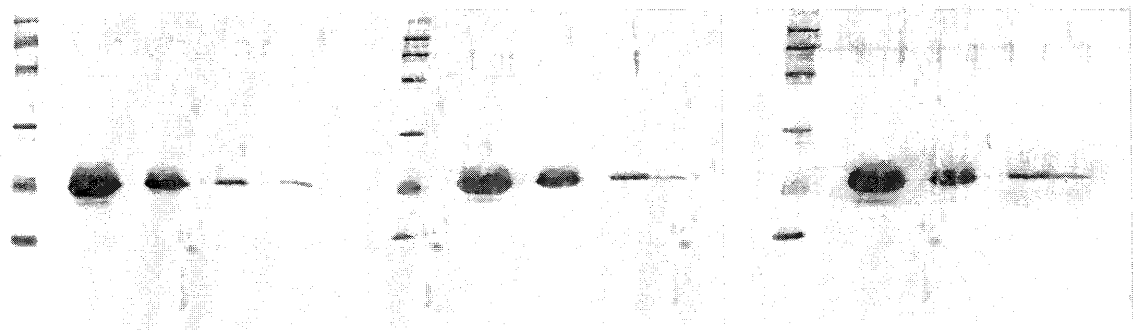

Banco de células de trabalho
1 via
Crescimento inóculo (500 ml frasco)
pH médio 7.6-7.8
Inoculação por frasco 0.25 ml
Temperatura (30±2)°C
Taxa de agitação 300 rpm
Tempo de cultivo 21-22 h
100 ml Susp. de célula.
Produção de fermentação
Temperatura 37°C
pH 6.8
pO2 20%
Densidade óptica 90-110 o.u.
Indução 0.5 mM IPTG
Tempo de cultivo 3.0 h
Resfriamento 20°C
Glicose 2-15 g/L
Susp. de célula
Colheita de biomassa com centrífuga de tambor tubular
Temperatura 12-15°C
Velocidade de bombeamento 35 L/h
Velocidade de centrifugação 20 000 rpm
Biomassa (≥1200 g)
Congelamento e armazenamento de Biomassa
Temperatura de congelamento e armazenamento (-33±5)°C

Fig. 7

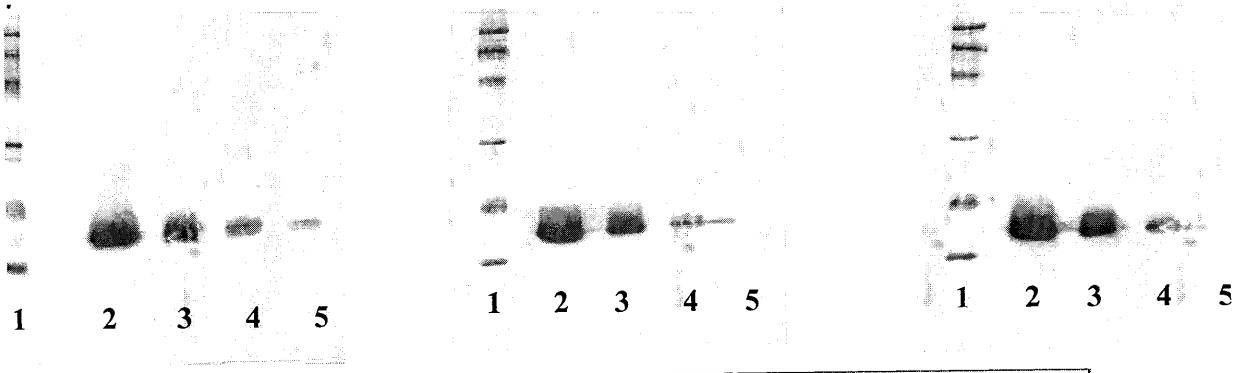
Condições de redução



Lote P9-0020607	Lote P9-0060608	Lote P9-0070608
Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg	Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg	Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg

Fig. 8A

Condições de não redução



Lote P9-0020607	Lote P9-0060608	Lote P9-0070608
Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg	Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg	Pistas: 1. - Padrões de proteína LMW (Bio-Rad, de cima para baixo - 97.400; 66.200; 45.00; 31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg 5. - 0.05 µg

Fig. 8B

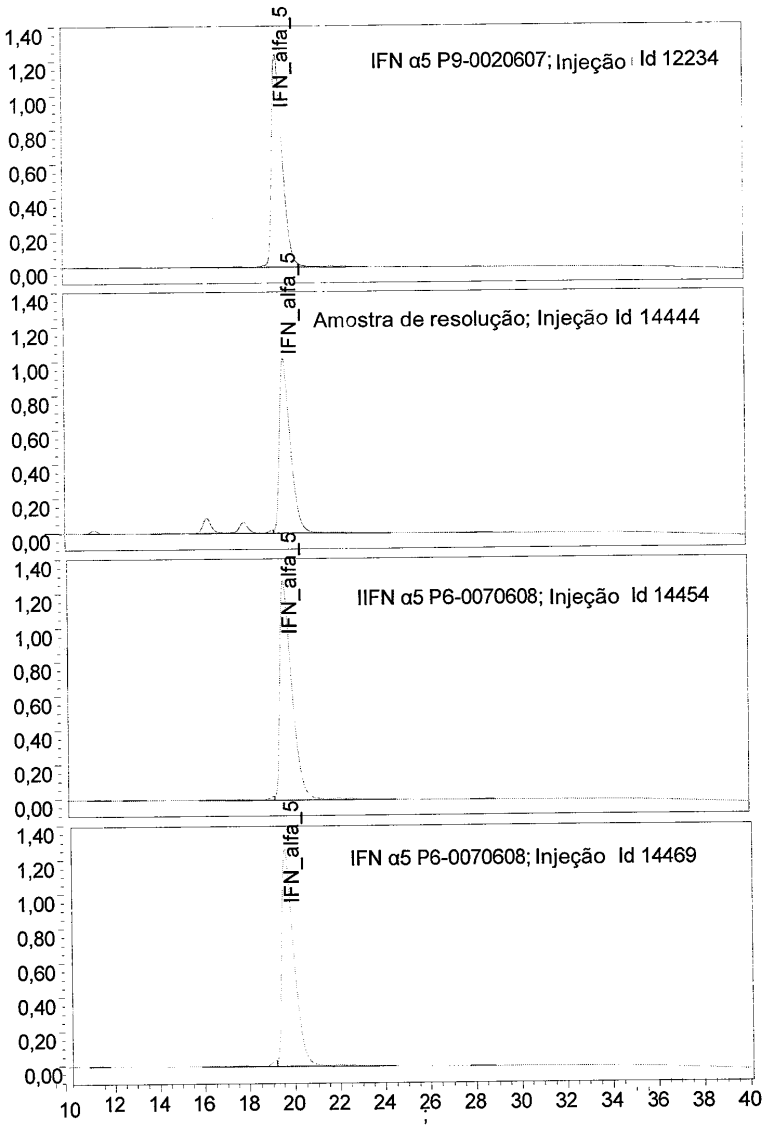

IFN_alfa_5
IFN α5 P9-0020607; Injeção Id 12234
IFN_alfa_5
Amostra de resolução; Injeção Id 14444
IFN_alfa_5
IIFN α5 P6-0070608; Injeção Id 14454
IFN_alfa_5
IFN α5 P6-0070608; Injeção Id 14469
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40

Fig. 9

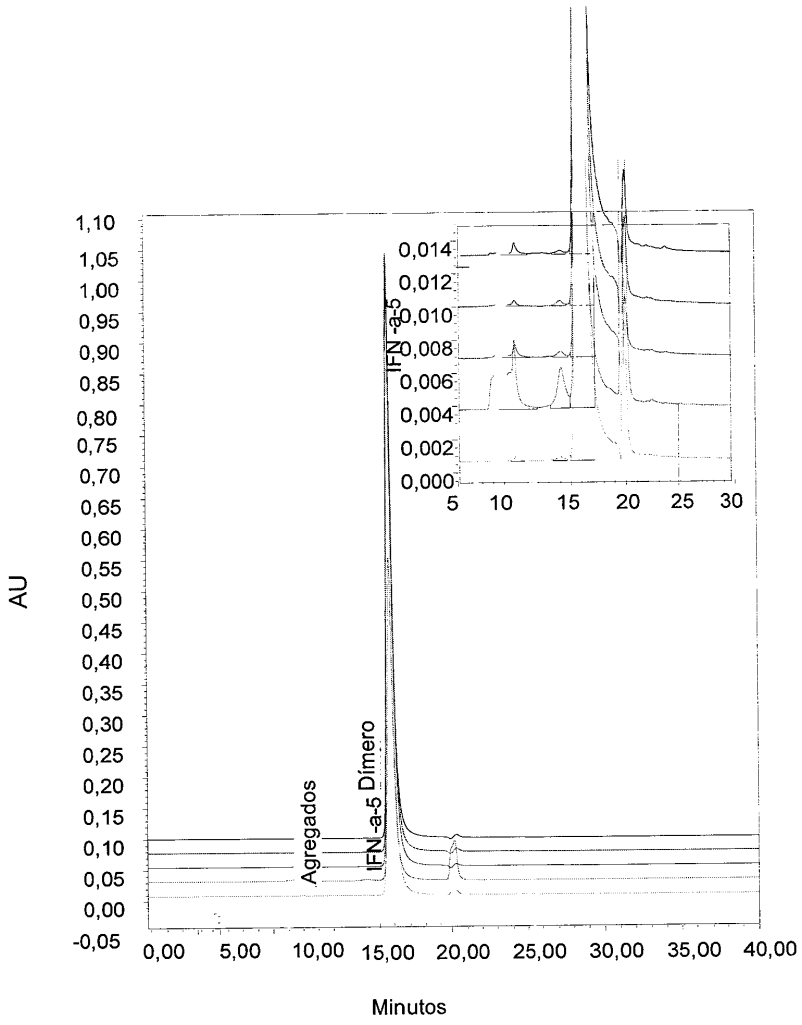

AU
1,10
1,05
1,00
0,95
0,90
0,85
0,80
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
Minutos
Agregados
IFN -a-5 Dímero
IFN -a-5
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
5
10
15
20
25
30

Fig. 10

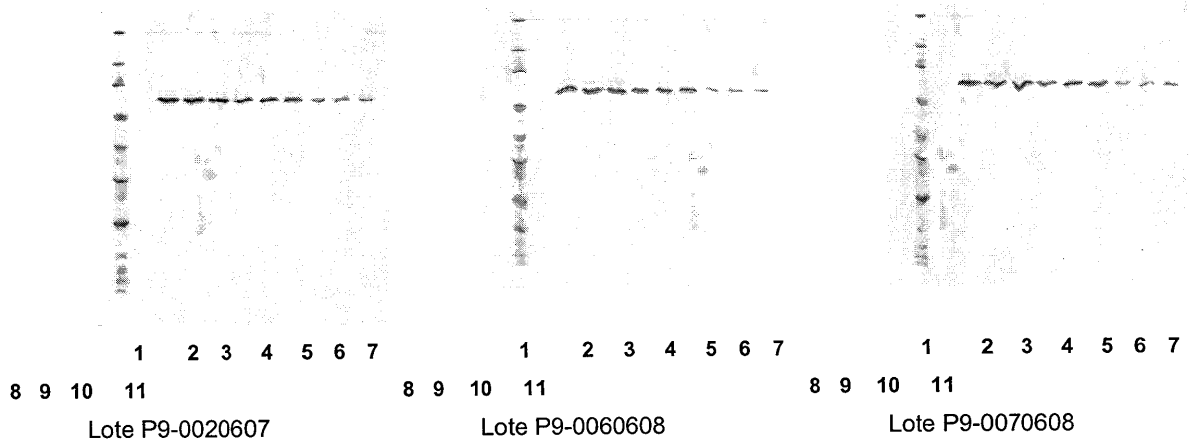

1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
Lote P9-0020607
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
Lote P9-0060608
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
Lote P9-0070608

Fig. 11

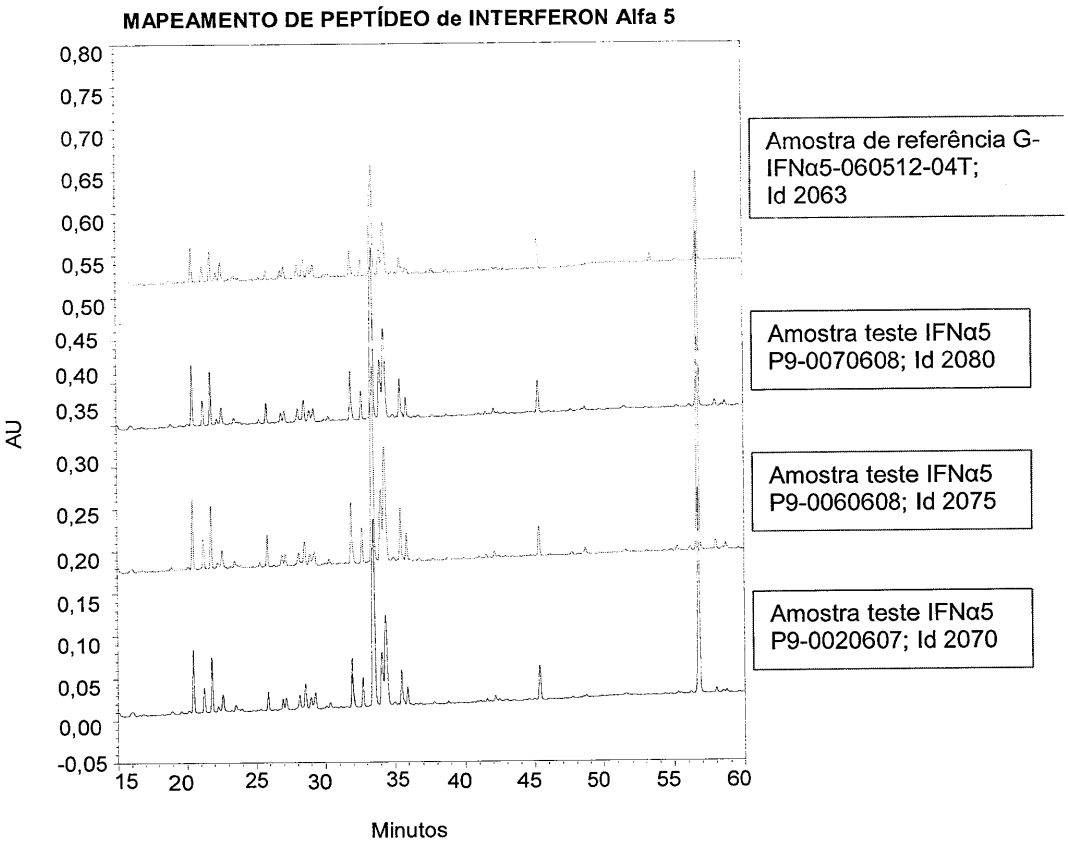

MAPEAMENTO DE PEPTÍDEO de INTERFERON Alfa 5
AU
0,80
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Minutos
Amostra de referência G-IFNα5-060512-04T; Id 2063
Amostra teste IFNα5 P9-0070608; Id 2080
Amostra teste IFNα5 P9-0060608; Id 2075
Amostra teste IFNα5 P9-0020607; Id 2070

Fig. 12