



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 070**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/65 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03006278 .0**

96 Fecha de presentación : **21.10.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1323820**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54

Título: **Procedimiento para la recuperación facilitada de proteínas heterólogas a partir de células bacterianas.**

30

Prioridad: **28.10.1998 US 106052 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73

Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72

Inventor/es: **Leung, Woon-Lam Susan y**
Swartz, James R.

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 318 070 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).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la recuperación facilitada de proteínas heterólogas a partir de células bacterianas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción y recuperación de polipéptidos heterólogos a partir de células bacterianas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento por el que se facilita o incrementa la recuperación de polipéptidos heterólogos recombinantes solubles o agregados procedentes de citoplasma y periplasma bacteriano.

Descripción de divulgaciones relacionadas

Escherichia coli ha sido ampliamente utilizada para la producción de proteínas heterólogas en laboratorios e industria. *E. coli* generalmente no excreta proteínas al medio extracelular aparte de colicinas y hemolisina (Pugsley y Schwartz, *Microbiology*, 32:3-38 (1985)). Las proteínas heterólogas expresadas por *E. coli* pueden acumularse como producto soluble o como agregados insolubles. Ver figura 1 en el presente documento. Pueden encontrarse intracelularmente en el citoplasma o ser secretadas al periplasma si van precedidas por una secuencia de señal. Cómo iniciar la recuperación de los productos depende en gran medida de cómo y dónde se acumula el producto. Generalmente, para aislar las proteínas, las células pueden someterse a tratamientos para extracción periplásmica o desintegrarse para liberar productos atrapados que, de otra manera, serían inaccesibles.

El aislamiento convencional de polipéptidos heterólogos de bacterias Gram-negativas presenta problemas debido a las paredes celulares fuertes y rígidas que rodean a estas células. La pared celular bacteriana mantiene la forma de la célula y protege el citoplasma de presiones osmóticas que pueden causar la lisis celular; lleva a cabo estas funciones como resultado de un esqueleto de peptidoglicano altamente entrecruzado (también conocido como mureína) que proporciona a la pared su rigidez característica. Un modelo reciente describe el espacio entre las membranas citoplasmática y la externa como una fase continua llena con un gel polisacárido del periplasma interno que se extiende hacia un gel peptidoglicano externo altamente entrecruzado (Hobot *et al.*, *J.Bact.*, 160:143 (1984)). Este sáculo de peptidoglicano constituye una barrera para la recuperación de cualquier polipéptido heterólogo no excretado por el bacteria hacia el medio.

Para liberar proteínas recombinantes del periplasma de *E.coli*, se han utilizado tratamientos que implican compuestos químicos tal como cloroformo (Ames *et al.*, *J.Bacteriol.*, 160:1181-1183 (1984)), guanidina-HCl, y Triton X-100 (Naglak y Wang, *Enzyme Microb.Technol.*, 12:603-611 (1990)). Sin embargo, estos compuestos químicos no son inertes y pueden tener efectos perjudiciales sobre muchos productos de proteína recombinante o sobre procedimientos posteriores de purificación. El tratamiento con glicina de las células de *E.coli*, que causa la permeabilización de la membrana externa, también se ha dado a conocer como forma de liberar el contenido periplasmático (Ariga *et al.*, *J.Ferm.Bioeng.*, 68:243-246 (1989)). Estos métodos de liberación periplasmática a pequeña escala se han diseñado para sistemas específicos. No se traducen fácilmente ni eficientemente y generalmente son inadecuados como métodos a gran escala.

Los métodos más ampliamente utilizados de liberación periplasmática de proteínas recombinantes son el choque osmótico (Nosal y Heppel, *J.Biol.Chem.*, 241:3055-3062 (1966); Neu y Heppel, *J.Biol.Chem.*, 240:3685-3692 (1965)), el tratamiento con clara de huevo de gallina (HEW)-lisozima/etilendiamina ácido tetraacético (EDTA) (Neu y Heppel, *J.Biol.Chem.*, 239:3893-3900 (1964); Witholt *et al.*, *Biochim.Biophys.Acta*, 443:534-544 (1976); Pierce *et al.*, *ICHEME Research Event*, 2:995-997 (1995)), y el tratamiento combinado de lisozima-HEW/choque osmótico (French *et al.*, *Enzyme and Microb.Tech.*, 19:332-338 (1996)). Típicamente, estos procedimientos incluyen una disrupción inicial en medio osmóticamente estabilizante, seguido de la liberación selectiva en medio no estabilizante. La composición de estos medios (pH, agente protector) y los métodos disruptivos utilizados (cloroformo, lisozima-HEW, EDTA, sonicación) varían entre los procedimientos específicos dados a conocer. Una variación sobre el tratamiento lisozima-HEW/EDTA que hace uso de un detergente iónico dipolar en lugar de EDTA se discute en Stabel *et al.*, *Veterinary Microbiol.*, 38:307-314 (1994). Para una evaluación general de la utilización de sistemas enzimáticos intracelulares de lisis para alterar *E.coli*, ver Dabora y Cooney en *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 43, A. Fiechter, ed. (Springer-Verlag: Berlin, 1990), páginas 11-30.

Los métodos convencionales para la recuperación de proteína recombinante del citoplasma, como proteína soluble o como partículas refráctiles, implicaban la desintegración de la célula bacteriana mediante rotura mecánica. La disrupción mecánica típicamente implicaba la generación de cavitación local en una suspensión líquida, agitación rápida con perlas rígidas, sonicación, o molido de la suspensión celular (*Bacterial Cell Surface Techniques*, Hancock y Poxton (John Wiley & Sons Ltd., 1988), Capítulo 3, página 55). Estos procedimientos requieren una inversión significativa de capital y suponen un tiempo de procesamiento largo.

Lisozima-HEW actúa bioquímicamente para hidrolizar el esqueleto de peptidoglicano de la pared celular. El método fue inicialmente desarrollado por Zinder y Arndt, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 42:586-590 (1956), quienes trataron *E.coli* con albúmina de huevo (que contiene lisozima-HEW) para producir esferas celulares redondeadas, conocidas posteriormente como esferoplastos. Estas estructuras conservaban algunos componentes de la pared celular pero tenían grandes áreas en las que la membrana citoplasmática quedaba expuesta.

La patente US nº 5.169.772 da a conocer un método de purificación de heparinasa a partir de bacterias que comprende la disrupción de la cubierta de las bacterias en un medio osmóticamente estabilizado, por ejemplo, en solución de sacarosa al 20%, por ejemplo, EDTA, lisozima, o un compuesto orgánico, liberando las proteínas no similares a heparinasa del espacio periplásmico de las bacterias alteradas mediante la exposición de éstas a un tampón de baja fuerza iónica, y liberando las proteínas similares a heparinasa mediante la exposición de las bacterias lavadas con tampón de baja fuerza iónica a una solución salina tamponada.

Existen varias desventajas en la utilización de la adición lisozima-HEW para aislar proteínas periplasmáticas. Las células deben tratarse con EDTA, detergente, o pH elevado, todos los cuales ayudan a debilitar las células. Además, el método no es adecuado para la lisis de grandes cantidades de células porque la adición de lisozima es ineficiente y existe la dificultad de dispersar el enzima en un pellet grande de células.

Se han utilizado muchas modificaciones diferentes de estos métodos sobre una amplia variedad de sistemas de expresión con diversos grados de éxito (Joseph-Liazun *et al.*, *Gene*, 86:291-295 (1990); Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). Aunque estos métodos han funcionado a escala de laboratorio, implican demasiadas etapas para un procedimiento de recuperación eficiente a gran escala.

Se han dado a conocer esfuerzos para inducir en cultivos celulares recombinantes la producción de lisozima. La patente nº EP 155.189 da a conocer un medio para inducir un cultivo celular recombinante a producir lisozimas, que generalmente se esperaría que serían letales para tales células huésped mediante la destrucción o lisado de la estructura de la pared celular. Las patentes rusas nº 2043415, nº 2071503, y nº 2071501 dan a conocer plásmidos y las cepas correspondientes para producir proteínas recombinantes y purificar aglomerados proteicos insolubles en agua que implican el gen de la lisozima. Específicamente, la utilización de un operón consistente del gen de la lisozima y un gen que codifica proteína recombinante permite la síntesis concurrente de la proteína recombinante y de una lisozima que rompe la membrana polisacárida de *E.coli*.

La patente US nº 4.595.658 da a conocer un método para facilitar la externalización de las proteínas transportadas al espacio periplásmico de *E.coli*. Este método permite el aislamiento selectivo de proteínas localizadas en el periplasma sin necesidad de tratamiento con lisozima, molido mecánico, o tratamiento de choque osmótico de las células. La patente US nº 4.637.980 da a conocer la producción de un producto bacteriano mediante la transformación de un lisógeno sensible a la temperatura con una molécula de ADN que codifica, directa o indirectamente, el producto, el cultivo del transformante bajo condiciones permisivas para expresar el producto génico intracelularmente, y la externalización del producto mediante la elevación de la temperatura para inducir funciones codificadas en el fago. La patente nº JP 61-257931 publicada el 15 de noviembre, 1986, da a conocer un método de recuperación de IL-2 utilizando lisozima-HEW. Asami *et al.*, *J.Ferment. and Bioeng.*, 83:511-516 (1997) dan a conocer la disrupción sincronizada de células *E.coli* mediante infección por el fago T4, y Tanji *et al.*, *J.Ferment. and Bioeng.*, 85:74-78 (1998) dan a conocer la expresión controlada de genes de lisis codificados en el fago T4 para la disrupción suave de las células de *E.coli*.

El desarrollo de un método enzimático de liberación para recuperar proteínas periplasmáticas recombinantes adecuadas para su utilización a gran escala se da a conocer en French *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology*, 19:332-338 (1996). Este método implica la resuspensión de las células en un tampón de fraccionamiento seguido de recuperación de la fracción periplasmática, donde el choque osmótico sigue inmediatamente al tratamiento con lisozima. También se discuten los efectos de la sobreexpresión de la proteína recombinante *S. thermoviolaceus* α -amilasa, y la fase de crecimiento del organismo huésped tras la recuperación.

En un procedimiento a escala de 10 kilolitros para la recuperación de polipéptido IGF-I (Hart *et al.*, *Bio/Technology*, 12:1113 (1994)), los autores intentaron el procedimiento típico de aislamiento que implica una etapa de rotura mecánica de las células, seguida de una etapa de centrifugación para recuperar los sólidos. Los resultados fueron decepcionantes debido a que casi 40% del producto total se perdió en el sobrenadante tras tres pasadas por el homogeneizador Gaulin. Hart *et al.*, *Bio/Technology* 12:1113 (1994). Ver figura 2 en el presente documento. No se mejoró significativamente la recuperación de producto incluso cuando se utilizaron las técnicas clásicas de adición de EDTA y lisozima-HEW.

Si bien la lisozima-HEW es la única lisozima comercial que resulta práctica para los procedimientos a gran escala, la lisozima es expresada por bacteriófagos al infectar las células huésped. La lisis de *E.coli*, un huésped natural para los bacteriófagos, por ejemplo los fagos T4, requiere la acción de dos productos génicos: e y t. El gen e codifica una lisozima (llamada lisozima-T4, por el fago T4) que ha sido identificada como una muramidasa (Tsugita y Inouye, *J.Biol.Chem.*, 243:391 (1968)), mientras que el gen t parece que es necesario para la lisis, pero no parece tener actividad de lisozima. El gen t es necesario para detener el metabolismo celular que ocurre durante la lisis (Mukai *et al.*, *Vir.*, 33:398 (1967)) y se cree que degrada o altera la membrana citoplasmática, permitiendo, de esta manera, que el producto del gen e alcance el periplasma y tenga acceso a la pared celular (Josslin, *Vir.*, 40:719 (1970)). Los fagos son formados por mutantes gen t^- , pero la lisis del huésped *E.coli* no ocurre excepto por adición de cloroformo (Josslin, *supra*). La actividad lisozima-T4 de tipo salvaje es la que primero se detecta, aproximadamente ocho minutos después de la infección de T4 a 37°C, y aumenta durante el resto de la infección, incluso si se reduce la inhibición de lisis. En ausencia de adsorción secundaria, las células infectadas por mutantes de gen e detienen la producción de progenie y su metabolismo en el tiempo normal, pero no lisan (*Molecular Genetics of Bacteriophage T4*, J.D. Karam, editor jefe (American Society for Microbiology, Washington DC, ASM Press, 1994), página 398).

ES 2 318 070 T3

Se dio a conocer la recuperación de IGF-I insoluble utilizando lisozima-T4 el 28 de octubre de 1997 en la “*Separation Technology VII meeting entitled “Separations for Clean Production”*” en Davos, Suiza, patrocinado por la Engineering Foundation.

5 Tras la lisis celular, el ADN genómico se escapa del citoplasma al medio y resulta en un incremento significativo en la viscosidad del líquido que puede impedir la sedimentación de sólidos en el campo centrífugo. En ausencia de fuerzas friccionales, tal como las ejercidas durante la disrupción mecánica para romper los polímeros de ADN, la tasa de sedimentación de sólidos más lenta en el líquido viscoso resulta en una separación pobre de sólidos y líquido durante la centrifugación. Aparte de fuerza mecánica friccional, existen enzimas nucleolíticas que degradan el
10 polímero de ADN.

En *E.coli*, el gen *endA* endógeno codifica una endonucleasa (peso molecular de la proteína madura es de, aproximadamente, 24,5 kD) que normalmente es segregada al periplasma y corta ADN en oligodesoxirribonucleótidos de una manera endonucleolítica. Se ha sugerido que *endA* es expresado de manera relativamente débil por *E.coli*
15 (Wackernagel *et al.*, *Gene*, 154:55-59 (1995)).

Para controlar el coste de los materiales y minimizar el tiempo de procesamiento, existe una necesidad continuada de incrementar la recuperación total de polipéptido heterólogo de las células. A grandes escalas, existe un incentivo significativo de evitar la rotura mecánica de las células para liberar los polipéptidos recombinantes solubles o agregados de los compartimientos citoplasmático y periplasmático y para preparar el lisado para la recuperación eficiente de producto en la etapa posterior.
20

Sumario de la invención

25 De acuerdo con lo anterior, la presente invención da a conocer un procedimiento que utiliza la disrupción bioquímica para recuperar productos heterólogos solubles e insolubles de las células bacterianas.

Dicho procedimiento comprende:

30 (a) cultivar las células, que comprenden

un primer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo y una secuencia de señal para la secreción del polipéptido heterólogo, estando dicho primer ácido nucleico unido a un primer promotor inducible,

35 un segundo ácido nucleico que codifica la lisozima de fago,

y un tercer ácido nucleico que codifica una proteína que muestra la actividad de digestión de ADN bajo el control de una secuencia de señal para la secreción de la proteína digestora de ADN,

40 en el que dichos segundo y tercer ácidos nucleicos están unidos funcionalmente a un segundo promotor que es el mismo para ambos y en el que ambos están unidos en el mismo constructo de ácido nucleico, y en el que el segundo promotor es

(i) inducible o

45 (ii) un promotor constitutivo débil o un promotor con un nivel basal bajo que no requiere la adición de un inductor para funcionar como un promotor,

y en el que el primer promotor inducible y el segundo promotor son diferentes entre sí y, cuando el segundo promotor es un promotor inducible, responden a diferentes inductores;

50 (b) añadir un inductor específico para la inducción de la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo a partir del primer promotor inducible,

55 (c) únicamente cuando el cultivo es mediante (a) (i) anteriores, añadir un segundo inductor específico para el segundo promotor inducible tras la acumulación de aproximadamente 50% o más de la acumulación máxima del polipéptido heterólogo que se debe recuperar,

(d) lisar las células, y

60 (e) recuperar el polipéptido heterólogo acumulado a partir del caldo lisado.

La lisis bioquímica o lisis mecánica asistida bioquímicamente es superior a la disrupción mecánica en la recuperación de polipéptidos heterólogos de células bacterianas. La expresión coordinada de ácido nucleico que codifica lisozima de fago y proteína de digestión de ADN, y de ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo de interés,
65 proporciona un método altamente efectivo para liberar los polipéptidos insolubles o solubles enredados con la capa de peptidoglicano, así como para liberar producto atrapado en el citoplasma. Cuando se clona el gen de lisozima de fago detrás de un promotor de control estricto, por ejemplo, el promotor pBAD (también denominado promotor ara),

puede inducirse la acumulación citoplasmática de lisozima de fago mediante la adición de un inductor (tal como arabinosa) en un momento apropiado cerca del final de la fermentación. Al colocar bajo control de promotores separados la expresión de los ácidos nucleicos en polipéptidos heterólogos y en enzimas líticos, uno puede regular de manera independiente su producción durante la fermentación. Sin una secuencia de señal, el lisozima de fago acumulado se encuentra estrictamente encerrado en el compartimiento citoplasmático. Además, el pH óptimo para la actividad de lisozima de fago T4, la cual es una realización preferida, es aproximadamente 7,3, que es aproximadamente el pH neutro para la mayoría de caldos de cultivo.

La inducción de los genes que codifican la lisozima de bacteriófago y la proteína de digestión del ADN, tras la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, resulta en la recuperación en cantidad significativa del citoplasma o periplasma de las bacterias. Además del rendimiento de producto, el éxito de un procedimiento de recuperación se valora a partir de la simplicidad de la operación, flujo del procedimiento, y duración del ciclo, así como el coste de la operación. La presente invención mitiga varios, si no todos, estos cuellos de botella durante el procedimiento de recuperación a gran escala.

El procedimiento en el presente documento también permite la utilización de lisis bioquímica de la célula a elevada densidad celular y escala incrementada. A densidad elevada, la expresión excesiva de lisozima de T4, y endA podría tener resultados desastrosos, tal como la lisis celular prematura y la reducción en la producción de polipéptido heterólogo. Además, no sería de esperar que la inducción al final de un largo proceso de fermentación, y tras una acumulación sustancial de producto, produjese suficientes enzimas líticas para ser efectivo. El presente procedimiento no plantea problemas a elevadas densidades celulares, tal como viscosidad incrementada y espumación excesiva durante el proceso de fermentación. Se espera que el procedimiento en el presente documento permitirá conseguir elevada densidad celular, inducción y acción efectiva del sistema, y el procesamiento de lisados de caldos derivados de cultivos de elevada densidad.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de cómo se dispone un producto polipeptídico en el citoplasma y en el periplasma, es decir, si forma un agregado, fragmento proteolítico, o polipéptido soluble plegado.

La figura 2 muestra la recuperación de agregado IGF-I del sobrenadante y pellet mediante el procedimiento típico de aislamiento que implica la interrupción mecánica celular seguida de centrifugación, tras tres pasadas por el homogeneizador Gaulin.

La figura 3 muestra un mapa del plásmido pS1130, un plásmido de expresión para el precursor de la cremallera de rhuMab CD18 F(ab')₂-leucina (también denominado en el presente documento fragmento de anticuerpo anti-CD18).

Las figuras 4A-4B muestran la secuencia del cassette de expresión de pS1130 (SEC ID n°:1 y n°:2).

La figura 5 muestra la construcción del plásmido pJJ154, utilizado para co-exresar el lisozima y endA de T4 (ADNasa de *E.coli*).

La figura 6 muestra un mapa del plásmido pLBIGF57, utilizado para expresar IGF-I.

La figura 7 muestra la construcción del plásmido pJJ155, utilizado para expresar el lisozima, endA, y gen t de T4, construido a partir de pJJ154.

La figura 8 muestra un esquema del sistema de dos plásmidos para la co-expresión de la lisozima de T4, una lisozima preferente de fago, endA, una proteína digestora preferente de ADN, y el gen t (pJJ155) con ácido nucleico codificante de IGF-I de acuerdo con un ejemplo de la presente invención.

Las figuras 9A-9E dan a conocer fotografías de microscopía de contraste de fases del caldo de cultivo y pellets resuspendidos procedentes de la centrifugación de caldo de fermentación con y sin co-expresión de lisozima, endA y gen t de T4, antes y después de la adición de EDTA. Específicamente, las fotografías muestran el pellet resuspendido procedente de la centrifugación de caldo de control, sin co-expresión de enzima lítico, antes y después de la adición de EDTA, respectivamente (figuras 9A y 9B), el caldo completo no diluido de recolección de la fermentación resultante de la co-expresión de IGF-I con los tres enzimas líticos, lisozima, endA y gen t de T4 (figura 9C), el pellet resuspendido procedente de la centrifugación de caldo de recolección con co-expresión de IGF-I con los tres enzimas líticos y sin adición de EDTA (figura 9D), y el pellet resuspendido procedente de la centrifugación de caldo de recolección con co-expresión de IGF-I, con los tres enzimas líticos y con adición de EDTA (figura 9E).

Las figuras 10A y 10B muestran, respectivamente, la cuantificación de ácidos nucleicos en el sobrenadante y pellet mediante determinación de la DO₂₆₀ de *E.coli* que expresa IGF-I con co-expresión de los tres enzimas líticos frente al control, y proteína total en el sobrenadante y pellet de *E.coli* que expresan IGF-I, con co-expresión de los tres enzimas líticos frente al control de no co-expresión.

La figura 11 muestra la recuperación de producto IGF-I mediante centrifugación utilizando tres enzimas líticos frente al caldo de control sin lisis a varias velocidades de centrifugación.

La figura 12 muestra la recuperación de sólidos durante la centrifugación utilizando tres enzimas líticas co-expresados con IGF-I frente al caldo control de no lisis para varias velocidades de centrifugación.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

A. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, “lisozima de fago” se refiere a un enzima citoplasmático que facilita la lisis de células bacterianas infectadas por fagos, liberando de las mismas, partículas replicadas de fago. El lisozima puede ser de cualquier origen bacteriófago, incluyendo los bacteriófagos T7, T4, lambda y mu. De éstas, la lisozima preferente en el presente documento es la lisozima de T4.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “lisozima-T4” o “proteína E” se refiere a una muramidasa citoplasmática que facilita la lisis de células bacterianas infectadas por fagos T4, liberando de esta manera partículas replicadas de fago (Tsugita y Inouye, *J.Mol.Biol.*, 37:201-12 (1968); Tsugita y Inouye, *J.Biol.Chem.*, 243:391-97 (1968)). Está codificado por el gen e del bacteriófago T4 e hidroliza los enlaces entre los residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en la capa rígida de peptidoglicano de la cubierta celular de *E.coli*. El enzima es una cadena polipeptídica única de un peso molecular de 18,3 kDa. Este enzima es aproximadamente 250 veces más activo que la lisozima-HEW en su actividad contra el peptidoglicano bacteriano (Matthews *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 147:545-558 (1981)). El pH óptimo para la actividad enzimática del lisozima de T4 es 7,3, frente a 9 de la lisozima-HEW (*The Worthington Manual*; páginas 219-221).

Tal como se utiliza en la presente memoria, “gen t” u “holin” se refieren a un gen lítico de bacteriófago T4 que es necesario para la lisis pero que parece tener actividad de lisozima. Ver también *Molecular Genetics of Bacteriophage T4*, *supra*, páginas 398-399.

El término “proteína que muestra actividad digestora de ADN” o “proteína de digestión de ADN” se refiere a una proteína que digiere ADN, tal como, por ejemplo, ADNasa de mamífero o bacteriana. Preferentemente, la proteína digestora de ADN es una ADNasa humana o endA bacteriana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase “enzimas líticas” se refiere colectivamente a por lo menos lisozima de fago y proteína digestora de ADN; en su caso, también se refiere a un producto génico de gen t de fago o equivalente en combinación con lisozima y proteína digestora de ADN de fago.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase “agente que altera la pared celular externa” de las bacterias se refiere a una molécula que incrementa la permeabilidad de la pared celular externa de las bacterias, tal como agentes quelantes, por ejemplo EDTA, y zwitteriones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “bacterias” se refiere a cualquier bacteria que produzca proteínas que sean transportadas al espacio periplasmático. Generalmente, las bacterias, sean Gram positivas o Gram negativas, tienen bajo control la expresión de las lisozimas y nucleasas de fago de manera que sólo se expresan cerca del final de la fermentación, una realización preferida, o se expresan a nivel bajo durante la fermentación. La nucleasa es, en general, relativamente estable cuando es secretada al periplasma o al medio. El término “bacterias no sensibles térmicamente” se refiere a cualquier bacteria que no es significativamente sensible a cambios de temperatura. Una realización preferida en el presente documento son bacterias que no son sensibles térmicamente. Las bacterias de mayor preferencia en el presente documento son las bacterias Gram negativas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “tiempo suficiente para liberar el polipéptido contenido en el citoplasma o periplasma” se refiere a una cantidad de tiempo suficiente para permitir al lisozima digerir el peptidoglicano en grado suficiente para liberar el polipéptido heterólogo agregado o soluble, citoplasmático o periplasmático.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “secuencia de señal” o “polipéptido de señal” se refiere a un péptido que puede ser utilizado para segregar el polipéptido o proteína heteróloga que muestra actividad digestora de ADN hacia el periplasma de las bacterias. Las señales para el polipéptido heterólogo o proteína digestora de ADN pueden ser homólogos a la bacteria, o pueden ser heterólogos, incluyendo señales nativas al polipéptido heterólogo o proteína digestora de ADN que se está produciendo en las bacterias.

Los promotores de la presente invención pueden ser promotores “inducibles”, es decir, promotores que dirigen la transcripción a tasa incrementada o reducida tras la unión de un factor transcripcional.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un promotor “con baja expresión basal” o un “promotor de baja expresión basal” es un promotor que es ligeramente débil, es decir, proporciona un nivel de expresión basal suficientemente bajo para no afectar el crecimiento celular o acumulación de producto y proporciona un nivel suficientemente bajo de promoción para no resultar en la lisis celular prematura.

“Factores transcripcionales” tal como se utiliza en la presente memoria incluye cualquier factor que pueda unirse a un región reguladora o de control de un promotor y, de esta manera, producir la transcripción. La síntesis o la capacidad de unión al promotor de un factor transcripcional dentro de la célula huésped puede controlarse mediante la exposición

ES 2 318 070 T3

del huésped a un “inductor”, o eliminando un “represor” del medio de la célula huésped. De acuerdo con esto, para regular la expresión de un promotor inducible, se añade un inductor o se elimina un represor del medio de crecimiento de la célula huésped.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase “inducir la expresión” significa incrementar la cantidad de transcripción de genes específicos mediante la exposición de las células que contienen tales genes a un efector o inductor.

10 Un “inductor” es un agente químico o físico que, al administrarlo a una población de células, incrementará la cantidad de transcripción de genes específicos. Éstas habitualmente son moléculas pequeñas cuyos efectos son específicos de operones o grupos de genes particulares, y pueden incluir azúcares, alcohol, iones metálicos, hormonas, calor, frío, y similares. Por ejemplo, isopropiltio- β -galactosidasa (IPTG) y lactosa son inductores del promotor tacII, y la L-arabinosa es un inductor adecuado del promotor arabinosa.

15 Un “represor” es un factor que conduce directa o indirectamente al cese de la acción del promotor o reduce ésta. Un ejemplo de un represor es fosfato. Al agotarse el represor fosfato en el medio, el promotor fosfatasa alcalina (AP) es inducido.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, “polipéptido” o “polipéptido de interés” se refiere generalmente a péptidos y proteínas con más de, aproximadamente, diez aminoácidos. Los polipéptidos son “heterólogos”, es decir, foráneos a la célula huésped que se está utilizando, tal como una proteína humana producida por *E.coli*. El polipéptido puede producirse como agregado insoluble o como un polipéptido soluble en el espacio periplasmático o citoplasma.

25 Entre los ejemplos de polipéptidos de mamífero se incluyen moléculas tales como, por ejemplo, la renina, una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana; la hormona del crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona del crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α 1-antitripsina; cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; proinsulina; trombopoyetina; hormona folículo-estimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tal como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrands; factores de anti-coagulación, tal como la Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor del crecimiento hematopoyético; factor alfa y beta del tumor necrótico; encefalina, una albúmina sérica tal como la albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; relaxina cadena A; relaxina cadena B; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; ADNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); receptores de hormonas o de factores del crecimiento; integrina; proteína A ó D; factores reumatoídes; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5 ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5, ó NT-6), o un factor del crecimiento nervioso tal como NGF- β ; cardiotrofinas (factor de la hipertrofia cardíaca) tal como cardiotrofina-1 (CT-1); factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor del crecimiento fibroblástico, tal como aFGF y bFGF; factor del crecimiento epidérmico (EGF); factor del crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ó TGF- β 5; factor-I y factor-II de crecimiento similar a insulina (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor del crecimiento similar a insulina; proteínas CD, tal como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonia (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; anticuerpo anti-HER-2; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas membranales de superficie; factor acelerador de la degeneración; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la cubierta de HIV; proteínas de transporte; receptores de tráfico celular; adhesinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados.

50 Los polipéptidos exógenos preferentes de interés so polipéptidos de mamífero, con la mayor preferencia polipéptidos humanos. Entre los ejemplos de tales polipéptidos de mamífero se incluyen t-PA, VEGF, gp120, anti-HER-2, anti-CD11a, anti-CD18, ADNasa, IGF-I, IGF-II, IGF-I cerebral, hormona del crecimiento, cadenas de relaxina, factor de liberación de hormona del crecimiento, cadenas de insulina o proinsulina, uroquinasa, inmunotoxinas, neurotrofinas, y antígenos. Entre los polipéptidos de mamífero particularmente preferentes se incluyen, por ejemplo, IGF-I, ADNasa, ó VEGF, con la mayor preferencia, IGF-I, si el polipéptido es producido como un agregado insoluble en el periplasma, y anticuerpos anti-CD18 o fragmentos de los mismos, tal como fragmentos de anti-CD18 recombinante humano Fab, Fab' y (Fab')₂, si el polipéptido es producido en una forma soluble en el periplasma.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, “IGF-I” se refiere a factor del crecimiento similar a insulina de cualquier especie, incluyendo bovina, ovina, porcina, equina, y preferentemente humana, en secuencia nativa o en forma variante y producida por recombinación. En un método preferente, el IGF-I se clona y su ADN se expresa, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en la patente n° EP 128.733 publicada el 19 de diciembre de 1984.

65 La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para bacterias incluyen un promotor tal como el promotor fosfatasa alcalina, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión del ribosoma.

Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una pre-secuencia o líder secretorio está operativamente unido a ADN para un polipéptido heterólogo si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión del ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situada de manera que facilite la traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. El unido se consigue por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se utilizan adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o conectores de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular”, y “cultivo celular” se utilizan intercambiamente, y todas tales designaciones incluyen la progenie. De esta manera, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen las células primarias, y los cultivos derivados de las mismas, sin importar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante con la misma función o actividad biológica según se ha explorado en la célula originariamente transformada. Cuando se pretendan denominaciones diferentes, resultarán evidente a partir del contexto.

B. Modos de llevar a cabo la invención

La invención proporciona un procedimiento de recuperación de un polipéptido heterólogo, soluble o insoluble, de células bacterianas en las que es producido. Este procedimiento implica, en una primera etapa, el cultivo de células bacterianas, las cuales comprenden ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, cuyo ácido nucleico está unido a un primer promotor, y ácido nucleico que codifica los enzimas líticos, en las que estos ácidos nucleicos están unidos a un segundo promotor inducible.

El cultivo tiene lugar bajo condiciones en las que la expresión de los ácidos nucleicos que codifican los enzimas líticos, cuando son inducidos, comienza después de que se haya acumulado aproximadamente 50% ó más de polipéptido heterólogo, y bajo condiciones en las que la lisozima de fago se acumula en un compartimiento citoplasmático y la proteína digestora de ADN es secretada hacia el compartimiento periplasmático.

En el procedimiento en la presente memoria, resulta preferida la inducción de los promotores; sin embargo, el procedimiento también contempla la utilización de un promotor para el lisozima de fago y proteína digestora de ADN que es un promotor de baja expresión basal (ligeramente débil), de manera que no se lleva a cabo inducción alguna. Este tipo de promotor tiene una debilidad suficientemente baja para no resultar en la lisis celular prematura y resulta en un nivel de expresión basal suficientemente bajo para no afectar al crecimiento celular o acumulación de producto.

En una segunda etapa, se recupera de las células bacterianas el polipéptido heterólogo acumulado. Puede añadirse un agente que incrementa la permeabilidad de la pared celular externa de las células bacterianas, según se describe en detalle posteriormente, antes de llevar a cabo la etapa de recuperación. La necesidad de alterar mecánicamente las células para liberar la lisozima de fago se ve reducida o completamente eliminada. En una realización preferida, tras la expresión de los enzimas líticos, las células se incuban durante un tiempo suficiente para liberar el polipéptido heterólogo contenido en el citoplasma o en el periplasma.

Si bien el procedimiento puede aplicarse a la recuperación de agregados insolubles, tal como IGF-I, VEGF, y ADNasa por sedimentación del producto, también es aplicable a polipéptidos heterólogos que son solubles en el citoplasma o en el periplasma, tal como, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo anti-CD18. Entre las ventajas de la recuperación de polipéptidos heterólogos solubles por lisis celular bioquímica se incluyen la prevención o reducción de la necesidad de lisis mecánica, evitando de esta manera la pérdida de proteínas lábiles térmicamente, y obteniendo una viscosidad del líquido baja y consistente, compatible con procedimientos de recuperación corriente abajo, tal como la tecnología de adsorción de lecho expandido y la centrifugación.

La cromatografía de adsorción de lecho expandido (EBA), descrita, por ejemplo, en “Expanded Bed Adsorption: Principles and Methods”, *Pharmacia Biotech*, ISBN 91-630-5519-8), es útil para la recuperación inicial de proteínas diana de carga de alimentación o cultivos celulares crudos. Las etapas de procedimiento de clarificación, concentración, y purificación inicial pueden combinarse en una operación de unidad única, mejorando la economía del procedimiento debido al número reducido de etapas, incrementando el rendimiento, tiempo de procesamiento global más corto, menores costes laborales, y costes reducidos. En la cromatografía EBA se expande un adsorbente y se equilibra mediante la aplicación de un flujo de líquido hacia arriba en la columna. Se forma un lecho fluidizado estable cuando las partículas adsorbentes se encuentran suspendidas en el equilibrio debido al equilibrio entre la velocidad de sedimentación de las partículas y la velocidad de flujo hacia arriba del líquido. Se aplica al lecho expandido una mezcla celular o caldo lisado crudo con un flujo hacia arriba. Las proteínas diana se unen al adsorbente, mientras que los residuos celulares y otros contaminantes pasan a través sin dificultad. El material unido débilmente se lava del lecho expandido utilizando un flujo hacia arriba de un tampón de lavado. A continuación, se detiene el flujo y se permite que el adsorbente se deposite en la columna. A continuación, se baja el adaptador de la columna a la superficie del lecho sedimentado. Se revierte el flujo y las proteínas capturadas se eluyen del lecho sedimentado utilizando un tampón apropiado. El eluido consiste en la proteína diana en un volumen reducido de pool eluido, purificado parcialmente en preparación de la cromatografía de lecho empaquetado (*Pharmacia Biotech, supra*). En la EBA, en la que el lisado

ES 2 318 070 T3

celular completo que contiene el producto soluble se bombea hacia arriba a través de la columna, la proteína se adsorbe sobre una resina (lecho fluidizado), y los residuos celulares fluyen a través y se eluyen, se hace uso de solamente una etapa de cromatografía, ahorrando de esta manera una etapa.

5 En el procedimiento anterior, mientras que la secuencia de señal para la proteína digestora de ADN puede ser cualquier secuencia, preferentemente es una secuencia nativa de la proteína digestora de ADN. Además, en una realización preferida, la proteína digestora de ADN es ADNasa o es bacteriana, por ejemplo, producto *endA* de *E.coli*.

10 En una forma de realización preferida, la etapa de cultivo tiene lugar bajo condiciones de elevada densidad celular, es decir, generalmente a una densidad celular de, aproximadamente, 15 a 150 g peso seco/litro, preferentemente por lo menos, aproximadamente, 40, con mayor preferencia, aproximadamente 40-150, con la mayor preferencia, aproximadamente 40 a 100. En densidad óptica, 120 DO₅₅₀ (A₅₅₀) es, aproximadamente, 50 g peso seco/litro. Además, el cultivo puede conseguirse utilizando cualquier escala, incluso escalas muy grandes de 100.000 litros. Preferentemente, la escala es de, aproximadamente, 100 litros o mayor, con mayor preferencia de por lo menos, aproximadamente, 500
15 litros, y con la mayor preferencia, aproximadamente entre 500 litros y 100.000 litros.

Los ácidos nucleicos que codifican los enzimas líticos están unidos a un promotor, es decir, colocados en tándem, como introduciendo un conector entre los ácidos nucleicos. El promotor para la expresión del polipéptido heterólogo es diferente del utilizado para los enzimas líticos, de manera que uno es inducido antes que el otro. Si bien los promotores
20 puede ser cualquier promotor adecuado para este fin, preferentemente, los promotores para los enzimas líticos, con o sin gen *t*, y polipéptido heterólogo son, respectivamente, promotor arabinosa, y promotor fosfatasa alcalina.

Los promotores para el polipéptido heterólogo y para los enzimas líticos en la presente memoria deben ser diferentes, de manera que la expresión codificada en ácido nucleico del polipéptido heterólogo se induzca antes de la expresión de los enzimas líticos codificados en ácido nucleico, o a un nivel mucho más alto, cuando los promotores
25 son inducibles. Si bien los promotores pueden ser cualquier promotor adecuado para este fin, preferentemente, los promotores para la lisozima de fago y el polipéptido heterólogo son, respectivamente, el promotor arabinosa y el promotor fosfatasa alcalina. Alternativamente, la compartimentalización de la lisozima de fago y la proteína digestora de ADN puede permitir la utilización de un promotor con baja expresión basal para la expresión del ácido nucleico que
30 codifica la lisozima de fago y la proteína digestora de ADN. Si se utiliza un promotor con baja expresión basal, tal como arabinosa, y no el promotor *tac* o el promotor *trp*, entonces no se requiere una etapa activa de inducción.

La inducción de la expresión del ácido nucleico que codifica los enzimas líticos se lleva a cabo preferentemente mediante la adición de un inductor al medio de cultivo. Si bien, en este aspecto, los inductores para los promotores
35 pueden añadirse en cualquier cantidad, preferentemente si el inductor es arabinosa, se añade en una cantidad de, aproximadamente, 0-1% en peso, y si se añade inductor, 0,1-1% en peso.

En el procedimiento descrito anteriormente, típicamente se introducen los elementos de expresión en las células por transformación, pero también pueden integrarse en el genoma o cromosoma de las células junto con sus regiones
40 promotoras. Esto es aplicable a cualquiera de los enzimas líticos o al gen del polipéptido heterólogo. Las células bacterianas pueden transformarse con uno o más vectores de expresión que contengan el ácido nucleico que codifica los enzimas líticos, y el ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo. En una realización como ésta, las células bacterianas son transformadas con dos vectores que contienen, respectivamente, el ácido nucleico que codifica los enzimas líticos y el ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo. En otra realización, el ácido nucleico que
45 codifica los enzimas líticos y el ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo se introducen en un solo vector con el que se transforman las células bacterianas. En otra forma de realización específica que puede ser preferente, la lisozima de fago y enzima de fago digestor de ADN se introducen en un plásmido para asegurar un elevado número de copias.

50 En la primera etapa del procedimiento anterior, el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, cADN o ADN genómico) se inserta adecuadamente en un vector replicable para su expresión en la bacteria bajo el control de un promotor adecuado para las bacterias. Hay disponibilidad de muchos vectores para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y de la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación del ADN o expresión del ADN) y de la célula huésped particular con la que es compatible. Los componentes vector
55 para la transformación bacteriana pueden incluir una secuencia de señal para el polipéptido heterólogo e incluirán una secuencia de señal para la proteína digestora de ADN, y también incluirán un promotor inducible para el polipéptido heterólogo, y un promotor inducible o uno no inducible con baja expresión basal para los otros enzimas líticos. También incluyen generalmente un origen de replicación y uno o más genes marcadores.

60 En general, los vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan con huéspedes bacterianos. El vector habitualmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden permitir la selección fenotípica de células transformadas. Por ejemplo, *E.coli* se transforma típicamente con pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E.coli*. Ver, por ejemplo, Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95 (1977). pBR322 contiene genes que confieren resistencia a la ampicilina y tetraciclina y, de esta manera, proporcionan un medio fácil de identificar las células transformadas. El plásmido pBR322, u otro plásmido microbiana o fago, también contiene generalmente, o se modifica para que contenga, promotores que
65 pueden ser utilizados por el organismo bacteriana para expresar los genes marcadores seleccionables.

Si el polipéptido heterólogo debe secretarse, el ADN codificante del polipéptido heterólogo de interés en el presente documento contiene una secuencia de señal, por ejemplo una en el extremo N-terminal del polipéptido heterólogo maduro. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN insertado en el vector que codifica el polipéptido heterólogo. La secuencia de señal heteróloga seleccionada debería ser una secuencia que sea reconocida y procesada (es decir, cortada mediante una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped bacterianas que no reconocen y procesan la secuencia de señal polipéptido heterólogo nativo, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia bacteriana de señal seleccionada, por ejemplo entre el grupo que consiste en los líderes fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp, o enterotoxina termoestable II.

Los vectores de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas en una diversidad de bacterias. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuada para la mayoría de bacterias Gram-negativas.

Los vectores de expresión contienen asimismo generalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio selectivo de cultivo. Las células no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina-racemasa para *Bacilli*. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son transformadas con éxito con un gen heterólogo, producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, de esta manera, sobreviven el régimen de selección.

El vector de expresión para producir un polipéptido heterólogo también contiene un promotor inducible que es reconocido por el organismo huésped bacteriana y está operativamente unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo de interés. También contiene un promotor separado inducible o de basa expresión basal, que está operativamente unido al ácido nucleico que codifica los enzimas líticos. Entre los promotores inducibles adecuados para su utilización con huéspedes bacterianos se incluyen los sistemas β -lactamasa y promotor lactosa (Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)), el sistema promotor arabinosa, incluyendo el promotor *araBAD* (Guzman *et al.*, *J.Bacteriol.*, 174:7716-7728 (1992); Guzman *et al.*, *J.Bacteriol.*, 177:4121-4130 (1995); Siegle y Hu, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94:8168-8172 (1997)), el promotor ramnosa (Haldimann *et al.*, *J.Bacteriol.*, 180:1277-1286 (1998)), el promotor fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (*trp*) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980), y patente n° EP 36.776), los promotores $P_{Ltet0-1}$ y $P_{lac/ara-1}$ (Lutz y Bujard, *Nucleic Acids Res.*, 25:1203-1210 (1997)), y promotores híbridos, tal como el promotor *tac*, de Boer *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 80:21-25 (1983). Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos, inducibles y de baja expresión basal. Sus secuencias nucleotídicas han sido publicadas, permitiendo a un experto, de esta manera, ligarlos operativamente a ADN codificante del polipéptido heterólogo de interés, o a los ácidos nucleicos que codifican los enzimas líticos (Siebenlist *et al.*, *Cell*, 20:269 (1980)) utilizando conectores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido. Si se utiliza un promotor fuerte y altamente "leaky", tal como el promotor *trp*, se utiliza generalmente sólo para la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo y no para el ácido nucleico que codifica los enzimas líticos. Los promotores *tac* y P_L podrían utilizarse para uno entre el polipéptido heterólogo y los enzimas líticos, pero no para ambos, aunque no son preferentes. Son preferentes el promotor fosfatasa alcalina para el producto, y el promotor arabinosa para los enzimas líticos.

Los promotores de uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido heterólogo de interés. El promotor puede ser eliminado del ADN de origen bacteriano mediante digestión con enzima de restricción e insertado en el vector que contiene el ADN deseado. El promotor *phoA* puede ser eliminado del ADN de origen bacteriano mediante digestión con enzima de restricción e insertado en el vector que contiene el ADN deseado.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente mencionados utiliza técnicas de ligación estándares. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se cortan, adaptan, y re-ligan en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Para el análisis de confirmación de las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan las mezclas de ligación para transformar *E.coli* K12 cepa 294 (ATCC n° 31.446), u otras cepas, y se seleccionan los transformantes exitosos utilizando la resistencia a la ampicilina o tetraciclina según el caso. Se preparan plásmidos a partir de los transformantes, se analizan mediante digestión de endonucleasa de restricción, y/o se secuencian mediante el método de Sanger *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 74:5463-5467 (1977), o de Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981), o mediante el método de Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65:499 (1980).

Entre las bacterias adecuadas para este fin se incluyen las arqueobacterias y eubacterias, especialmente las eubacterias, con mayor preferencia las bacterias Gram-negativas, y con la mayor preferencia, las *Enterobacteriaceae*. Entre los ejemplos de bacterias útiles se incluyen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, y *Paracoccus*. Entre los huéspedes *E.coli* se incluyen *E.coli* W3110 (ATCC n° 27.325), *E.coli* 294 (ATCC n° 31.446), *E.coli* B, y *E.coli* X1776 (ATCC n° 31.537). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos. También pueden utilizarse células mutantes de cualquiera de las bac-

ES 2 318 070 T3

terias anteriormente mencionadas. Evidentemente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* pueden ser utilizadas adecuadamente como huésped cuando se utilicen plásmidos bien conocidos, tal como pBR322, pBR325, pACYC177, ó pKN410 para suministra el replicón.

5 *E. coli* cepa W3110 es un huésped preferente porque es una cepa huésped común para las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para producir una mutación genética en los genes que codifican proteínas. Ejemplos de tales huéspedes incluyen *E. coli* W3110 cepa 1A2, la cual tiene el genotipo completo tonAΔ (también conocido como Δ*fhuA*); *E. coli* W3110 cepa 9E4, la cual tiene el genotipo completo tonAΔ ptr3;
10 *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC nº 55.244), la cual tiene el genotipo completo tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(*argF-lac*) 169 ompTΔ degP41kan^r; *E. coli* W3110 cepa 37D6, la cual tiene el genotipo completo tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(*argF-lac*) 169 ompTΔ degP41kan^r rbs7Δ ilvG; *E. coli* W3310 cepa 40B4, la cual es la cepa 37D6 con una mutación por delección degP de no resistencia a la canamicina; *E. coli* W3110 cepa 33D3, la cual tiene el genotipo completo tonA
15 prt3 lacIq LacL8 ompT degP kan^r; *E. coli* W3110 cepa 36F8, la cual tiene el genotipo completo tonA phoA Δ(*argF-lac*) ptr3 degP kan^r ilvG+, y es termo-resistente a 37°C; *E. coli* W3110 cepa 45F8, la cual tiene el genotipo completo *fhuA* (tonA) Δ(*argF-lac*) ptr3 degP41 (kanS) ΔompΔ(*nmpc-fepE*) ilvG+ phoA+ phoS*(T10Y); *E. coli* W3110 cepa 33B8, la cual tiene el genotipo completo tonA phoA Δ(*argF-lac*) 189 deoC degP IlvG+(kanS); *E. coli* W3110 cepa 43E7, la cual tiene el genotipo completo *fhuA*(tonA) Δ(*argF-lac*) ptr3 degP41(kanS) ΔompΔ(*nmpc-fepE*) ilvG+ phoA+; y una cepa
20 de *E. coli* con la o las proteasas periplasmáticas mutantes que se dan a conocer en la patente US nº 4.946.783 publicada el 7 de agosto de 1990.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos de la presente invención y se cultivan en medios nutrientes convencionales, modificados según resulte apropiado para inducir los diversos
25 promotores si se lleva a cabo inducción.

Transformación significa introducir ADN en un organismo de manera que el ADN sea replicable, bien como elemento extracromosómico, bien como parte integrante de un cromosoma. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar apropiadas para tales células. Generalmente, se utiliza
30 el tratamiento con calcio, con cloruro de calcio, según se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), para células bacterianas que contengan barreras sustanciales de pared celular. Otro método de transformación utiliza polietilenglicol/DMSO, según se describe en Chung y Miller, *Nucleic Acids Res.*, 16:3580 (1988). Aunque otro método es utilizar la técnica denominada electroporación.

35 Las células bacterianas utilizadas para producir el polipéptido heterólogo de interés descrito en la presente invención, se cultivan en medios adecuados en los que pueden inducirse los promotores como se describe generalmente en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*.

40 También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario, aparte de las fuentes de carbono, nitrógeno, y fósforo inorgánico, en concentraciones apropiadas, solos o en mezclas con otro suplemento o medio, tal como una fuente compleja de nitrógeno. El pH del medio puede ser cualquier pH en el intervalo aproximado 5-9, dependiendo, principalmente, del organismo huésped.

45 Para la inducción, típicamente las células se cultivan hasta alcanzar una densidad óptica determinada, por ejemplo, una A₅₅₀ de, aproximadamente, 80-100, en cuyo punto se inicia la inducción (por ejemplo, por adición de un inductor, por agotamiento de un represor, supresor, o componente del medio, etc.), para inducir la expresión del gen que codifica el polipéptido heterólogo. Cuando se ha acumulado aproximadamente 50% ó más del polipéptido heterólogo (según determina, por ejemplo, que la densidad óptica alcance un cantidad-objetivo que se ha observado en
50 el pasado que se correlaciona con la acumulación deseada de polipéptido heterólogo, por ejemplo, una A₅₅₀ de, aproximadamente, 120-140), se lleva a cabo la inducción del promotor de los enzimas líticos. La inducción típicamente tiene lugar en un momento en el tiempo después de la inoculación de, aproximadamente, 75-90%, con preferencia aproximadamente 80-90%, del tiempo total del proceso de fermentación, según la experiencia y ensayos anteriores. Por ejemplo, la inducción del promotor puede tener lugar entre las 30 horas aproximadamente, con preferencia
55 las 32 horas, y hasta aproximadamente las 36 horas después de la inoculación, en un proceso de fermentación de 40 horas.

La expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Northern convencional, para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77:5201-5205 (1980)).
60 Pueden utilizarse diversos marcajes, más habitualmente radioisótopos, en particular ³²P. Sin embargo, también pueden utilizarse otras técnicas, tal como la utilización de nucleótidos modificados con biotina, para su introducción en un polinucleótido. A continuación, la biotina sirve como sitio de unión para la avidina o para anticuerpos, los cuales pueden marcarse con una amplia variedad de marcajes, tal como con radionucleidos, compuestos fluorescentes, enzimas, o similares.

65 Para la acumulación de un producto génico expresado, se cultiva la célula huésped bajo condiciones suficientes para la acumulación del producto génico. Tales condiciones incluyen, por ejemplo, las condiciones de temperatura, nutrientes, y densidad celular que permitan la expresión proteica y acumulación por parte de la célula. Además,

tales condiciones son aquéllas bajo las que la célula puede llevar a cabo funciones celulares básicas de transcripción, traducción y transporte de proteínas desde un compartimiento celular hacia otro de las proteínas secretadas, como son conocidas por los expertos en la materia.

5 Tras la acumulación de producto, cuando las células han sido lisadas por los enzimas líticos expresados, opcionalmente antes de la recuperación de producto, se incuba el caldo de lisado durante un periodo de tiempo suficiente para liberar el polipéptido heterólogo contenido en las células. Este periodo de tiempo dependerá, por ejemplo, del tipo de polipéptido heterólogo que se recupera y de la temperatura, pero preferentemente estará comprendido entre, aproximadamente, 1 y 24 horas, más preferiblemente entre 2 y 24 horas, y con la mayor preferencia, entre 2 y 3 horas.
10 Si se da la sobre-digestión con el enzima, la mejora en la recuperación de producto no será tan grande.

En la segunda etapa de la presente invención, el polipéptido heterólogo, como producto soluble o insoluble liberado de la matriz celular, se recupera del lisado, de una manera que minimice la co-recuperación de residuos celulares con el producto. La recuperación puede realizarse de cualquier manera, pero preferentemente comprende la sedimentación de partículas refráctiles que contienen el polipéptido heterólogo, o la recolección de sobrenadante que contenga producto soluble. Un ejemplo de sedimentación es la centrifugación. En este caso, la recuperación tiene lugar, preferentemente, antes de la EBA o sedimentación, en presencia de un agente que altere la pared celular externa incrementando su permeabilidad y permitiendo una mayor recuperación de sólidos. Entre los ejemplos de tales agentes se incluyen un agente quelante, tal como EDTA, o un zwitterión, tal como, por ejemplo, un detergente iónico dipolar, tal como el detergente ZWITTERGENT 316TM. Ver Stabel *et al.*, *supra*. Con la mayor preferencia, la recuperación tiene lugar en presencia de EDTA. Otra técnica de recuperación de producto soluble es EBA, como se ha descrito anteriormente.

Si se utiliza la centrifugación para la recuperación, la fuerza relativa de centrifugación (RCF) es un factor importante. La RCF se ajusta para minimizar la co-sedimentación de residuos celulares con las partículas refráctiles liberadas de la pared celular con la lisis. La RCF específica utilizada para este fin variará dependiendo, por ejemplo, del tipo de producto a recuperar, pero es, preferentemente, de por lo menos, aproximadamente, 3.000 x g, más preferentemente de, aproximadamente, 3.500-6.000 x g, y con la mayor preferencia de, aproximadamente, 4.000-6.000 x g. En el caso de co-expresarse el gen t, aproximadamente 6.000 rpm proporcionan una recuperación tan buena a partir de partículas refráctiles del caldo lisado como a partir de células intactas.

La duración de la centrifugación dependerá de varios factores. La tasa de sedimentación dependerá de, por ejemplo, el tamaño, forma, y densidad de la partícula refráctil y de la densidad y viscosidad del líquido. El tiempo de sedimentación de los sólidos dependerá, por ejemplo, de la distancia y tasa de sedimentación. Es razonable esperar que las centrifugas continuas de discos funcionarán bien para la recuperación de agregados de polipéptido heterólogo liberado o para la eliminación de residuos celulares a gran escala, ya que estas centrifugas pueden procesar a elevadas velocidades de fluido debido a las relativamente grandes fuerzas centrífugas y a la distancia relativamente pequeña de sedimentación.

El polipéptido heterólogo capturado en la etapa inicial de recuperación puede, a continuación, purificarse adicionalmente separándolo de proteínas contaminantes. En una realización preferida, se aíslan los agregados de polipéptido heterólogo, seguido de una solubilización simultánea y re-plegamiento del polipéptido, según se da a conocer en la patente n° 5.288.931. Alternativamente, se recupera el producto soluble mediante técnicas estándar.

Los procedimientos siguientes son ejemplificativos de los procedimientos de purificación adecuados para el polipéptido heterólogo soluble liberado del periplasma o del citoplasma: fraccionamiento de inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase reversa; cromatografía en sílice o en resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; y filtración en gel utilizando, por ejemplo, SEPHADEXTM G-75.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo, pero sin limitación.

Ejemplo I

Co-expresión de enzimas líticos con producto soluble

55 A. *Co-expresión de lisozima-T4 y endonucleasa endA (no reivindicada)*

rhuMab CD18 es un fragmento recombinante de anticuerpo F(ab')₂ con dos cadenas ligeras de residuo 214 y dos cadenas pesadas de residuo 241. Se une al receptor MAC-1 (CD11b/CD18), bloqueando eficazmente la unión de neutrófilos al endotelio. En el proceso de fermentación descrito posteriormente, se produce rhuMab CD18 como un precursor de la cremallera de F(ab')₂-leucina en *E.coli* y se secreta hacia el periplasma. El procedimiento deseado de recuperación se concentra en la fracción soluble del producto acumulado y depende de la cremallera de F(ab')₂-leucina que se libera del periplasma para su captura inicial.

65 Se introdujo la co-expresión de lisozima-T4 para debilitar el sáculo de peptidoglicano, y se introdujo la sobre-expresión de proteína endA para degradar el ADN genómico liberado de las células bajo condiciones tales que las células son permeabilizadas o lisadas.

En *E.coli*, el gen endA codifica una endonucleasa normalmente secretada hacia el periplasma, que corta el ADN en oligodesoxirribonucleótidos de una manera endonucleolítica. Se ha sugerido que endA es expresado de manera relativamente débil por *E.coli* (Wackernagel *et al.*, *supra*). Sin embargo, la endonucleasa podría sobre-expresarse utilizando un plásmido compatible. Mediante la inserción de gen endA con su secuencia de señal detrás del cassette
 5 lisozima-T4-ara en el plásmido compatible pJJ153, ahora pJJ154, se inducirá la expresión de ambos la lisozima-T4 y la endonucleasa al añadir arabinosa. Si bien la lisozima-T4 está encerrada en el citoplasma, la endonucleasa se secreta hacia el espacio periplasmático y se mantiene alejada del ADN genómico, situado en el citoplasma durante el proceso de fermentación. Se espera que una degradación enzimática efectiva del ADN tras la lisis celular, reducirá o incluso eliminará las pasadas múltiples por el dispositivo de disrupción mecánica, una operación con frecuencia necesaria para
 10 ambas la disrupción celular y la reducción de la viscosidad. El éxito en esto comportaría una reducción significativa en tiempo y costes del procedimiento de recuperación.

Materiales y métodos

15 *Construcción del plásmido pS1130*: Se construyó el plásmido pS1130 (figura 3) para dirigir la producción de precursor de cremallera de rhuMab CD18 F(ab')₂-leucina en *E.coli*. Está basado en el plásmido bien caracterizado pBR322, con un cassette de expresión de 2138 pb (figura 4; SEC ID n°:1 y n°:2) insertado en el sitio de restricción EcoRI. El plásmido codifica la resistencia a ambos los antibióticos tetraciclina y beta-lactama. El cassette de expresión contiene copias únicas de cada gen unidas en tándem. La transcripción de cada gen en un solo ARNm dicistrónico está dirigida por el promotor *phoA* de *E.coli* (Chang *et al.*, *Gene*, 44:121-125 (1986)) y finaliza en el terminador t₀ del fago
 20 lambda (Scholtissek y Grosse, *Nuc.Acids Res.*, 15:3185 (1987)). Las señales de inicio de traducción para cada cadena proporciona las secuencias Shine-Dalgarno de STII (enterotoxina termo-estable) de *E.coli* (Picken *et al.*, *Infection and Immunity*, 42:269-275 (1983)).

25 rhuMab CD18 se creó por humanización del anticuerpo monoclonal murina muMab H52 (Hildreth y August, *J.Immunology*, 134:3272-3280 (1985)) utilizando un procedimiento previamente descrito para otros anticuerpos (Carter *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4285-4289 (1992); Shalaby *et al.*, *J.Exp.Med.*, 175:217-225 (1992); Presta *et al.*, *J.Immunol.*, 151:2623-2632 (1993)). Brevemente, se aislaron los ADNc que codifican los dominios de cadenas variables de muMab H52 ligeras (V_L) y pesadas (V_H), utilizando RT-PCR en una línea celular de hibridoma autorizada por Hildreth (Hildreth y August, obra anteriormente citada). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de muMab H52 se transplantaron en un gen marco de anticuerpo humano que codificaba huMab UCHT1-1 (Shalaby *et al.*, obra anteriormente citada) mediante mutagénesis dirigida. Se identificaron los residuos del marco murino no CDR que pudiesen influir sobre la afinidad del anticuerpo humanizado con su diana, CD18 humana, utilizando modelos moleculares. Estos residuos se alteraron mediante mutagénesis dirigida y se ensayó su influencia
 30 sobre la unión de CD18. Aquellos residuos del marco que mejoraron significativamente la afinidad, se incorporaron en el anticuerpo humanizado. El vector de expresión que codificaba la versión humanizada final de muMab H52 en un formato Fab' se denominó pH52-10,0 y es un derivado de pAK19 (Carter *et al.*, *BioTechnology*, 10:163-167 (1992)).

40 El plásmido pS1130 difiere de pH52-10,0 en la región codificante de cadena pesada. El extremo C-terminal de la cadena pesada se extendió desde CysProPro hasta la secuencia bisagra natural CysProProCysProAlaProLeuLeuGlyGly (SEC ID n°:3) y a continuación se fusionó con el dominio de cremallera de leucina de 33 residuos del factor transcripcional GCN4 de levadura. Como se ha descrito anteriormente, los dominios de cremallera de leucina se dimerizan para reunir dos moléculas Fab' y promover la formación de complejo F(ab')₂. Los dos residuos cisteína en la región bisagra de la cadena pesada se unen a continuación por enlace disulfuro a aquellos de un Fab' adyacente para formar un F(ab')₂ unido covalentemente.

Se construyó el plásmido pS1130 en un procedimiento multi-etapa descrito a grandes rasgos a continuación:

50 En primer lugar, se introdujo un origen de replicación fago filamentoso (f1) en pH52-10,0 para crear el plásmido pSO858. El plásmido pSO858 se construyó ligando el fragmento HindIII-HindIII de 1.977 pb, que contenía el cassette de expresión Fab' del pH52-10,0, con el fragmento HindIII-HindIII de 4.870 pb del plásmido pSO191 (denominado pHGhr (1-238) en Fuh *et al.*, *J.Biol.Chem.*, 265:3111-3115 (1990)).

55 En segundo lugar, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos sobre pSO858 para crear el plásmido zpi1#6. Se extendió la región codificante de cadena pesada para que incluyese los residuos bisagra de cisteína y el sitio de corte de la pepsina (CysProProCysProAlaProLeuLeuGlyGly; SEC ID n°:3). También se introdujo un sitio de restricción NotI. Se confirmó la secuencia del ADN introducida mediante secuenciación de ADN.

60 En tercer lugar, se generó un fragmento de ADN que codificaba el dominio cremallera de leucina de GCN4 flanqueado por los sitios de restricción NotI y SphI (patente n° WO98/37200 publicada el 27 de agosto de 1998). Este fragmento NotI-SphI de ADN de 107 pb se clonó posteriormente dentro de zip1#6, el cual se había cortado de manera similar, con el fin de crear el plásmido pS1111.

65 En cuarto lugar, la secuenciación de ADN del fragmento cremallera de leucina de GCN4 reveló un error en la secuencia codificante. Se corrigió este error mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y se confirmó mediante secuenciación de ADN. El plásmido correcto resultante se denominó pS1117.

ES 2 318 070 T3

La etapa final en la construcción de pS1130 fue restaurar el gen de resistencia a la tetraciclina y eliminar el origen f1 de pS1117. Esto se consiguió ligando el fragmento PstI-SphI de 2.884 pb de pS1117 que contenía el cassette de expresión de la cremallera Fab' con el fragmento PstI-SphI de 3.615 pb de pH52-10,0.

5 *Construcción del plásmido pJJ154:* El plásmido pJJ154 (figura 5) es un derivado de pACYC177 que es compatible con los vectores pBR322. Para construir pJJ154, pJJ153 como se ha descrito anteriormente se digirió con MluI y el fragmento de vector se ligó con gen endA amplificado por PCR diseñado para codificar extremos MluI. Se filtró la orientación correcta del plásmido mediante digestión de enzimas de restricción con el fin de producir pJJ154.

10 Se muestra en la figura 5 la construcción de pJJ153 (un derivado pACYC177 que es compatible con vectores pBR322). Se insertó el fragmento ClaI/AlwNI de pBR322 en pBAD18 digerido con ClaI/AlwNI (Guzman *et al.*, obra citada anteriormente) con el fin de producir pJJ70. A continuación, se llevó a cabo una ronda de mutagénesis dirigida, cambiando HindIII a StuI con el fin de obtener pJJ75. Se llevó a cabo una segunda ronda de mutagénesis dirigida para cambiar MluI por SacII, con el fin de producir pJJ76. A continuación, se ligaron los fragmentos XbaI/HindIII de pJJ76 y de pBKIGF2B, y se ligaron los fragmentos XbaI/HindIII de este producto de ligación y del plásmido lisozima-T4/tac para producir pT4LysAra. A continuación, se ligó pACYC177, digerido con BamHI (insertado)/ScaI, con pT4LysAra, digerido con ClaI/HindIII (ambos extremos con inserción) con el fin de producir pJJ153. Se muestran en la figura 5 los mapas de pACYC177, pT4LysAra y pJJ153.

20 *Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento:* Se utilizó la cepa 33B8 (*E.coli* W3110 *tonA phoA Δ(argF-lac) 189 deoC degP ilvG+(kanS)*) como el huésped de producción para la co-expresión de lisozima-T4 y proteína digestora de ADN del plásmido pJJ154 y la expresión de la cremallera de rhuMab CD18 F(ab')₂-leucina del plásmido pS1130. Se co-transformaron células competentes de 33B8 con pJJ154 y pS1130 utilizando procedimientos estándar. Se escogieron los transformantes de placas LB que contenían 20 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de canamicina (LB+Tet20+Kan50), se purificaron, y se cultivaron en caldo LB con 20 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de canamicina en un incubador-agitador a 37°C ó a 30°C previamente a su almacenamiento en DMSO a -80°C.

25 Para los controles, se transformó el huésped 33B8 con pS1130 y pJJ96 (análogo a pJJ154 excepto en que no se insertaron en el vector ácidos nucleicos que codificasen lisozima-T4 ni producto endA) y se aisló en un medio selectivo similar.

30 *Proceso de fermentación de cremallera de rhuMab CD18 F(ab')₂-leucina:* Se preparó un inóculo de matraz agitado mediante la inoculación de medio estéril con un cultivo stock recién descongelado. Se añadieron al medio antibióticos apropiados para generar una presión selectiva que asegurase la conservación del plásmido. En la Tabla 1 se proporciona la composición del medio del matraz agitado de cultivo. Se incubaron los matraces bajo agitación a, aproximadamente, 35 30°C (28°C-32°C) durante 14-18 horas. A continuación, se utilizó este cultivo para inocular el recipiente de producción fermentativa. El volumen de inóculo era de 0,1% a 10% del volumen inicial de medio.

40 La producción de la cremallera F(ab')₂, precursor de rhuMab CD18 se llevó a cabo en el medio de producción que se muestra en la Tabla 2. Se llevó a cabo el proceso de fermentación a una temperatura aproximada de 30°C (28-32°C) y a un pH aproximado de 7,0 (6,5-7,9). Se establecieron la tasas de aireación y de agitación para proporcionar una transferencia de oxígeno adecuada al cultivo. La producción de cremallera F(ab')₂, precursor de rhuMab CD18 se inició al agotarse el fosfato en el medio, típicamente 36-60 horas después de la inoculación.

45

TABLA 1

Composición del medio del matraz agitado de cultivo

50

| Ingrediente | Cantidad/litro |
|---|----------------|
| Tetraciclina | 4-20 mg |
| Triptona | 8-12 g |
| Extracto de levadura | 4-6 g |
| Cloruro sódico | 8-12 g |
| Fosfato sódico, añadido como solución de pH 7 | 4-6 mmol |

60

65

ES 2 318 070 T3

TABLA 2

Composición del medio de producción

| Ingrediente | Cantidad/litro |
|--|----------------|
| Tetraciclina | 4-20 mg |
| Glucosa ^a | 10-250 g |
| Sulfato amónico ^a | 2-8 g |
| Fosfato sódico, monobásico, dihidrato ^a | 1-5 g |
| Fosfato potásico, dibásico ^a | 1-5 g |
| Fosfato potásico, monobásico ^a | 0,5-5 g |
| Citrato sódico, dihidrato ^a | 0,5-5 g |
| Sulfato magnésico, heptahidrato ^a | 1,0-10 g |
| FERMAX ^{1Ma} (antiespumante) | 0-5 ml |
| Cloruro férrico, hexahidrato ^a | 20-200 mg |
| Sulfato de zinc, heptahidrato ^a | 0,2-20 mg |
| Cloruro de cobalto, hexahidrato ^a | 0,2-20 mg |
| Molibdato sódico, dihidrato ^a | 0,2-20 mg |
| Sulfato cúprico, pentahidrato ^a | 0,2-20 mg |
| Ácido bórico ^a | 0,2-20 mg |
| Sulfato de manganeso, monohidrato ^a | 0,2-20 mg |
| Digerido de caseína | 15-25 g |
| Metionina ^a | 0-5 g |
| Leucina ^a | 0-5 g |

^ainicialmente, se añadió una parte de estos ingredientes al fermentador, mientras que el resto se introdujo durante la fermentación. Se añadió hidróxido amónico según se requirió para el control del pH.

El momento de adición de la arabinosa estuvo comprendido entre 50 y 65 horas después de la inoculación. Se ensayaron los efectos de adiciones de bolus de 0,1% a 1% (concentración final) de arabinosa sobre la inducción de la co-expresión de lisozima-T4 y endonucleasa endA.

Se dejó fermentar durante aproximadamente 65 horas (60 a 72 horas), después de lo cual se recolectó el caldo para el tratamiento posterior de recuperación del producto.

Evaluación de la reducción en viscosidad del caldo mediante sobre-expresión de endonucleasa endA: Alícuotas de caldo de cultivo recolectado de la fermentación de cremallera de rhuMAb CD18 F(ab')₂-leucina con o sin co-expresión de producto endA, añadida además de la lisozima fágica descrita anteriormente, se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación. El caldo descongelado se diluyó 1:3 en agua, o en MgCl₂ 20 mM, previamente a su incubación al baño maría con agua a 37°C bajo agitación. Se retiraron las muestras a intervalos y se midió la viscosidad del caldo diluido utilizando un viscosímetro de caída de bola.

Resultados

Efecto de la sobre-expresión de EndA, añadido además de lisozima-T4, sobre la viscosidad del caldo: Como se muestra en la Tabla 3, el caldo de cultivo diluido descongelado-congelado procedente del proceso de fermentación anterior en ausencia de sobre-expresión de endA tenía una viscosidad superior a 800 cP al inicio de la incubación a 37°C. Tras 60 minutos de incubación, había cambiado poco la viscosidad del caldo de fermentación diluido con H₂O y congelado-descongelado, mientras que el caldo diluido con tampón MgCl₂ mostró una reducción significativa en la viscosidad del caldo. Tras extender la incubación a 37°C durante más de 2,5 horas, se estabilizó la viscosidad del caldo de cultivo diluido congelado-descongelado sin sobreexpresión de endA en adición de T4-lisozima en un valor aproximado de 40 cP. La viscosidad del caldo de cultivo diluido congelado-descongelado con sobre-expresión de endA era inferior a 20 cP incluso antes de su incubación a 37°C.

TABLA 3

| Co-expresión | Tratamiento | Incubación a 37°C (minutos) | Viscosidad del caldo (cP) |
|---|---|--------------------------------|------------------------------|
| Lisozima-T4 + endA (pJJ154) | Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 0 | <20 |
| | | 0 | <20 |
| | Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 60 | <20 |
| | | 60 | <20 |
| Lisozima-T4 sola (pJJ153) | Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 0 | >800 |
| | | 0 | >800 |
| | Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 60 | >800 |
| | | 60 | 36 |
| | Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 120 | 41 |
| | | 120 | 36 |
| Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 165 | 40 | |
| Control H ₂ O + MgCl ₂ 20 mM | 165 | 42 | |

B. Co-expresión de lisozima-T4, gen t, y endonucleasa EndA

Antecedentes

Según se describe en el Ejemplo IA, la sobre-expresión de endA comporta beneficios significativos en la reducción de la viscosidad de caldo permeabilizado o lisado. Ayuda a condicionar el caldo de fermentación para la etapa posterior de recuperación del producto. Mediante la co-expresión del lisozima-T4 y gen t, además de endA, las células pueden lisarse bioquímicamente y al mismo tiempo rendir un caldo lisado bien preparado con viscosidad de fluido suficientemente baja y compatible con las etapas de aislamiento del producto, tal como la centrifugación o la EBA.

El proceso de fermentación descrito anteriormente se utilizó para producir rhuMAb CD18 como precursor de una cremallera de F(ab')₂-leucina dirigida por el plásmido pS1130 en *E.coli*, con la co-expresión de enzimas líticos y proteína digestora de ADN dirigida por el plásmido pJJ155 en *E.coli*. El producto de fragmento de anticuerpo se secretó y acumuló en el periplasma. Los enzimas líticos se acumularon en un compartimiento alejado de su sustrato hasta su liberación por acción del producto del gen t. El procedimiento deseado de recuperación se concentra en la fracción soluble de la cremallera de F(ab')₂-leucina liberada del periplasma para su captura inicial.

Materiales y métodos

Construcción del plásmido pJJ155: De manera similar a pJJ154, pJJ155 es un derivado de pACYC177 que es compatible con vectores pBR322. Para construir pJJ155, pJJ154 según se ha descrito anteriormente, se digirió con KpnI, y el fragmento del vector se ligó con gen t amplificado por PCR y diseñado para codificar extremos KpnI. Se seleccionó el plásmido con la orientación correcta mediante digestión con enzimas de restricción para producir pJJ155. Se muestra en la figura 7 un mapa de pJJ155.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo: La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con 33B8 transformado según se ha descrito anteriormente, excepto en que se sustituyó pJJ154 por pJJ155.

Descripción del proceso de fermentación: Ver Ejemplo IA.

Resultados

El crecimiento celular de 33B8 co-transformado con pS1130 y pJJ155 (33B8/pS1130/pJJ155) no fue significativamente diferente del crecimiento del control (33B8 transformado solamente con pS1130). Tras la adición de 0,5% a 1% de arabinosa a las 50-65 horas para inducir la co-expresión de los enzimas líticos y la proteína digestora de ADN, la DO₅₅₀ del cultivo 33B8/pS1130/pJJ155 cayó con ritmo constante hasta un 30-40% de la densidad celular máxima, sugiriendo lisis celular.

La Tabla 4 muestra el efecto de la co-expresión de lisozima-T4 + endA + gen t sobre la liberación de fragmento soluble de anticuerpo anti-CD18 hacia el medio. Se ensayó mediante cromatografía HPLC de intercambio iónico el sobrenadante de la centrifugación del caldo de cultivo lisado tras incubación en presencia de EDTA 25 mM para cuantificar el producto. Se encontraron más de 80% de los fragmentos solubles de anticuerpo anti-CD18 en la fracción sobrenadante en la condición experimental en la que se inducía la co-expresión de enzimas líticos y proteína digestora de ADN, en comparación con menos de 10% en el control y en la condición en la que no había gen t (pJJ154) ni disrupción mecánica.

TABLA 4

| Co-expresión | % liberado del producto total |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ninguna (control) | <10 |
| Lisozima-T4 + endA (pJJ154) | <10 |
| Lisozima-T4 + endA + gen t (pJJ155) | >80 |

Conclusiones

La endonucleasa degrada el ADN y reduce la viscosidad del caldo. La sobre-expresión de la endonucleasa endógena de *E.coli* además de la lisozima-T4 reduce la necesidad de disrupción celular mecánica para la rotura de ADN liberado. La liberación de la lisozima fágica del compartimiento citoplasmático mediada por la proteína de expresión del gen t inicia el proceso de disrupción bioquímica, resultando en la lisis de las células y en la liberación del contenido celular, incluyendo el polipéptido heterólogo, ADN genómico, y proteína digestora del ADN, la cual había quedado atrapado en el periplasma o en el citoplasma hasta este momento. Mediante el mantenimiento del caldo lisado para la digestión apropiada de sustratos mediante la co-expresión de enzimas líticas y proteína digestora de ADN, se mejoraron la viscosidad del caldo y la liberación de producto de la matriz celular para una mejor recuperación del producto.

Ejemplo II

Co-expresión de enzimas líticas e IGF-I

Antecedentes

Debido a las necesidades a gran escala, se seleccionó IGF-I como el polipéptido heterólogo para la evaluación de la recuperación de partículas refráctiles. Se utilizó la co-expresión de enzimas líticas y proteína digestora de ADN para mejorar la liberación de las partículas refráctiles de IGF-I de las estructuras de pared celular sin utilizar disrupción mecánica.

Tras la lisis celular, además de liberar lisozima-T4 del compartimiento citoplasmático, el ADN genómico liberado del citoplasma habría contribuido significativamente a la viscosidad del líquido lisado del caldo. Por lo tanto, la co-expresión de una endonucleasa de *E.coli* junto con enzimas líticas fue útil en la reducción de la viscosidad del líquido tras la lisis celular y en la mejora de la recuperación de producto durante la centrifugación.

Materiales y métodos

Construcción del plásmido pLBIGF57: Se construyó el plásmido pLBIGF57 para la expresión de IGF-I (figura 6) a partir de un esqueleto básico de pBR322. Las secuencias transcripcionales y traduccionales requeridas para la expresión del ácido nucleico que codifica IGF-I las proporcionó el promotor *phoA* y la secuencia Shine-Dalgarno *trp*. La secreción de la proteína la dirigió una variante TIR de la secuencia de señal lamB. Esta variante TIR no altera la secuencia aminoacídica primaria de la señal lamB; sin embargo, los cambios silenciosos en la secuencia nucleotídica resultan, en esta variante particular, en un nivel incrementado de proteína traducida.

A continuación, se proporcionan los detalles de la construcción de pLBIGF57. Se construyó una biblioteca de codones de la secuencia de señal lamB para explorar las variantes de regiones de inicio de traducción (TIR) de diferente fuerza. Específicamente, se varió la tercera posición de los codones 3 a 7 de la secuencia de señal lamB. Este diseño conservaba la secuencia aminoacídica de tipo salvaje y, aún de esta manera, permitía las divergencias dentro de la secuencia nucleotídica.

Como se ha descrito anteriormente en la exploración de la biblioteca de codones de secuencia de señal STII (patente sudafricana n° ZA 96/1688; Simmons y Yansura, *Nature Biotechnology*, 14:629-634 (1996)), el producto del gen *phoA* sirvió como indicador para la selección de las variantes TIR de lamB. La biblioteca de codones de la secuencia de señal lamB se insertó corriente abajo del promotor *phoA* y del Shine-Dalgarno *trp*, y corriente arriba del gen *phoA*. Bajo condiciones de baja actividad transcripcional, la cantidad de fosfatasa alcalina secretada por cada constructo a partir de este momento era dependiente de la eficiencia de inicio traduccional proporcionada por cada variante TIR en la biblioteca. Utilizando este método, se seleccionaron variantes TIR de lamB que cubrían un intervalo aproximado de actividades de factor 10. Específicamente, la variante TIR de lamB #57 proporcionaba un TIR aproximadamente 1,8 veces más fuerte que los codones lamB de tipo salvaje, según el ensayo de actividad *phoA*.

El fragmento de vector para la construcción de pLBIGF57 se generó mediante la digestión de pBK131Ran con XbaI y SphI. Este vector XbaI-SphI contiene el promotor *phoA* y las secuencias Shine-Dalgarno *trp*. Las secuencias codificantes de IGF-I y el terminador transcripcional t_0 de lambda se aislaron a partir de pBKIGF-2B (patente US n° 5.342.763) después de la digestión con NcoI-SphI. Se aisló la secuencia de señal lamB a partir de pLBPhoTBK#57

ES 2 318 070 T3

(variante TIR #57; generada como se ha descrito anteriormente) seguido de la digestión con XbaI-NcoI. A continuación, se ligaron estos tres fragmentos para construir pLBIGF57.

5 *Cepas bacterianas y condiciones de cultivo:* La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con la cepa 43E7 (*E.coli* W3110 *fhuA(tonA) Δ(argF-lac) ptr3 degP41(kanS) ΔompTΔ(nmpc-fepE) ilvG+ phoA+*). Se utilizó un sistema de doble plásmido con plásmido de producto (pLBIGF57) y pJJ155 para los enzimas líticos. Se co-transformaron células competentes de 43E7 con pLBIGF57 y pJJ155 utilizando el procedimiento estándar. Se escogieron los transformantes tras cultivo en una placa LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina (LB + CARB50™) y 50 µg/ml de canamicina, se purificaron y cultivaron en caldo LB con 50 µg/ml de CARB50™ y 50 µg/ml de canamicina en un
10 agitador/incubador a 37°C, previamente a su ensayo en el fermentador.

15 Para la comparación, se utilizaron 43E7 transformadas solamente con pLBIGF57 en el caso control, llevado a cabo bajo condiciones similares. pLBIGF57 confiere resistencia a ambas la carbenicilina y la tetraciclina al huésped de producción y permite que 43E7/pLBIGF57 crezca en presencia de cualquiera de los dos antibióticos.

20 *Proceso de fermentación:* La composición del medio de fermentación y el protocolo experimental utilizado para la co-expresión del ácido nucleico que contenía IGF-I, endA, lisozima-T4, y gen t en caso de utilizarse, eran similares a los del procedimiento IGF-I a escala pequeña, de 10 kilolitros, de elevada tasa metabólica y alto rendimiento. Brevemente, se utilizó un cultivo original en matraz agitado de 43E7/pLBIGF57 ó 43E7/pLBIGF57/pJJ155 para inocular el medio enriquecido de producción. A continuación, se describe la composición del medio (con las cantidades de cada componente utilizadas por litro de medio inicial):

| <u>Ingrediente</u> | <u>Cantidad/litro</u> |
|--------------------------------------|---|
| 25 Glucosa* | 200-500 g |
| Sulfato amónico | 2-10 g |
| Fosfato sódico, monobásico dihidrato | 1-5 g |
| Fosfato potásico, dibásico | 1-5 g |
| 30 Citrato sódico, dihidrato | 0,5-5 g |
| Cloruro potásico | 0,5-5 g |
| Sulfato magnésico, heptahidrato | 0,5-5 g |
| Poliol PLURONIC™, L61 | 0,1-5 mL |
| 35 Cloruro férrico, heptahidrato | 10-100 mg |
| Sulfato de zinc, heptahidrato | 0,1-10 mg |
| Cloruro de cobalto, hexahidrato | 0,1-10 mg |
| Molibdato sódico, dihidrato | 0,1-10 mg |
| 40 Sulfato cúprico, pentahidrato | 0,1-10 mg |
| Ácido bórico | 0,1-10 mg |
| Sulfato de manganeso, monohidrato | 0,1-10 mg |
| Ácido hidroclicórico | 10-100 mg |
| 45 Tetraciclina | 4-30 mg |
| Extracto de levadura* | 5-25 g |
| NZ Amina AS* | 5-25 g |
| Metionina* | 0-5 g |
| 50 Hidróxido amónico | según se requiera para el control del pH |
| Ácido sulfúrico | según se requiera para el control del pH |

55 *Inicialmente, se añadió al medio una parte de la glucosa, extracto de levadura, NZ Amina AS, y metionina, añadiendo el resto durante la fermentación.

60 La fermentación fue un proceso alimentado por lotes en el que se fijaron los parámetros de fermentación de la manera siguiente:

| | |
|-------------------|--|
| Agitación: | Inicialmente a 800 RPM, incrementando a 1.000 RPM a 8 DO |
| Aireación: | 15,0 slpm |
| 65 Control de pH: | 7,3 |

ES 2 318 070 T3

| | | |
|----|------------------------------|--|
| | Temperatura: | 37°C |
| | Presión de retorno: | 0,7 barios |
| 5 | Carga de glucosa: | controlada por ordenador utilizando un algoritmo que regulaba la tasa de crecimiento a, aproximadamente, 95% del máximo en las fases tempranas de la fermentación, y que después pasaba a estabilizar la concentración de oxígeno disuelto (DO ₂) al 30% de saturación del aire a partir de su caída hasta el 30%. |
| 10 | Carga de nitrógeno complejo: | Tasa de alimentación constante de 0,5 mL/minuto durante todo el proceso. |
| | Duración del proceso: | 40 horas |

15 El tiempo de adición de arabinosa estaba comprendido entre las 24 y las 36 horas. Se ensayaron adiciones de bolus entre 0,1 y 1% de arabinosa (concentración final) para definir la fuerza de inducción necesaria para producir las cantidades de mayor preferencia de lisozima-T4 para una mejor recuperación de producto en la etapa de centrifugación.

20 *Recuperación de partículas refráctiles del caldo de cultivo:* Se recolectó el caldo al final de la fermentación al observar una caída objetivo de DO₅₅₀, y se procesó poco después, o bien se almacenó por poco tiempo a 4°C previamente a su utilización. El protocolo de ensayo implicaba cuatro etapas de procedimiento:

25 I. Adición de EDTA 1M al caldo de cultivo para llevar la concentración final de EDTA a 25 mM. El EDTA que la los cationes divalentes y altera la estructura de la superficie externa de la célula. Esto hace que la capa de peptidoglicano en el interior de las células no rotas sea accesible a la degradación por lisozima-T4 y debilita la pared celular, promoviendo la lisis de la célula.

II. Mantenimiento del lisado a temperatura ambiente o incubación a 37°C para la degradación adicional de la pared celular. Esta etapa simula los tiempos más largos de procesamiento asociados con el proceso a escala más grande.

30 III. Recuperación de partículas refráctiles y sólidos del lisado mediante centrifugación. Se utilizó la centrifugación a escala de laboratorio en un rotor GSA SORVALL™ a diferentes velocidades (3.000 rpm a 6.000 rpm; equivalente a una RCF de, aproximadamente, 2.500 g a 6.000 g, a rmax, respectivamente), para recoger los sólidos en forma de pellet.

35 Una etapa adicional de lavado de los pellets con tampón eliminaría el lisado arrastrado por los mismos, y minimizaría la cantidad de proteínas contaminantes de *E.coli* en las preparaciones de partículas refráctiles.

40 Se evaluó la recuperación de producto en muestras de sobrenadante y pellet procedentes de la centrifugación del caldo lisado resuspendido en tampón. Se analizó la cantidad de producto presente en las muestras mediante un método de HPLC en fase reversa. Se calculó la eficiencia de recuperación de producto expresando la cantidad de producto, recuperado en el pellet mediante la etapa del procedimiento, como un porcentaje del producto total presente en la combinación de pellet y sobrenadante. Para evaluar la calidad de las partículas refráctiles recuperadas, se midió la cantidad de proteína total presente en el pellet y en el sobrenadante mediante el método de Lowry (*J.Biol.Chem.*, 193:265 (1951)).

45 Se evaluó la contribución de la actividad endonucleasa como la eficiencia de recuperación de sólidos durante la sedimentación del caldo lisado por centrifugación. Además, se midió la cantidad de ácidos nucleicos presentes en el pellet y en el sobrenadante como las lecturas de DO₂₆₀.

50 *Resultados*

Fermentación y expresión de producto IGF-I

55 La figura 8 muestra, en general, el sistema de dos plásmidos utilizado en el presente Ejemplo para la co-expresión de enzimas líticos y endA con IGF-I utilizando pJJ155. La tasa inicial de crecimiento de 43E7/pLBIGF57/pJJ155 no mostró diferencias significativas con la del control 43E7/pLBIGF57. La densidades celulares máximas alcanzadas en estos caldos fueron similares. Sin embargo, en comparación con el control, se observó una pérdida significativa de densidad óptica en los cultivos tras la inducción para la co-expresión de enzimas líticos, indicando lisis celular. El examen del caldo de cultivo por microscopía de contraste de fases mostró que, en comparación con el control de 60 no co-expresión, había muy pocas células intactas de *E.coli* y eran evidentes las partículas refráctiles liberadas como resultado de la co-expresión de enzimas líticos y proteína digestora de ADN. Ver las figuras 9A-9E.

65 Las tasas de respiración en este conjunto de ensayos eran muy similares al control excepto por la pérdida continua significativa de tasa de asimilación de oxígeno (OUR) con pérdida concomitante en kla poco después de la adición de arabinosa.

El éxito de la técnica de lisis celular bioquímica según se describe en la presente invención es evidente a partir de las diferencias observadas en la distribución de ácidos nucleicos y proteína total entre fracción sólida (pellet) y líquida

ES 2 318 070 T3

(sobrenadante), como resultado de la co-expresión de los enzimas líticos y la proteína digestora de ADN, en comparación con el control, sin co-expresión (figuras 10A y 10B, respectivamente). Aumentaron ambos el porcentaje de ácidos nucleicos totales, calculado a partir de las lecturas de A260, y el porcentaje de proteína total, según mediciones por el ensayo de Lowry, en el sobrenadante de centrifugación del caldo lisado bioquímicamente en comparación con el caldo de control.

Se resume la recuperación de producto bajo las dos condiciones en la figura 11. En el caldo IGF-I lisado bioquímicamente, el producto IGF-I fue liberado junto con polímero ADN degradado al caldo lisado. La eficiencia de recuperación de las pequeñas y densas partículas refráctiles aumentó con la RCF utilizada durante la centrifugación. A medida que aumentaba la fuerza g utilizada, aumentaba el porcentaje del caldo lisado que se recuperaba como pellet (expresado como % pellet) (figura 12), al igual que la cantidad de producto IGF-I en el pellet. A aproximadamente 6.000 x g, cerca del 95% del producto había sido capturado en el pellet.

Conclusión

Según se da a conocer en el presente documento, una manipulación simple de la expresión génica durante el proceso de fermentación resulta en una lisis celular bioquímica que podría sustituir la disrupción mecánica convencional utilizada tradicionalmente para la recuperación de producto a escala de producción. La co-expresión o expresión coordinada de lisozima-T4 y producto de gen t *in vivo* es una técnica altamente efectiva para la desintegración de células, mientras que la proteína endA sobre-expresada degrada el ADN que se escapa, reduce la viscosidad del caldo, y condiciona eficientemente el caldo lisado para la recuperación de producto en la etapa inicial de captura del mismo. La lisis celular bioquímica es aplicable a la recuperación de producto soluble así como de producto insoluble. Es esencial la acumulación de los enzimas co-expresados en compartimientos alejados de sus sustratos hasta el momento deseado para la lisis celular, y esto constituye un diseño crítico de la invención. La invención proporciona una reducción significativa en el coste del proceso, tiempo de procesamiento, y por lo tanto, un coste de oportunidad respecto a otros productos que puedan compartir las mismas facilidades de producción.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la recuperación de polipéptido heterólogo a partir de células bacterianas, que comprende:

(a) cultivar las células, que comprenden

un primer ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo y una secuencia de señal para la secreción del polipéptido heterólogo, estando dicho primer ácido nucleico unido a un primer promotor inducible, un

y un tercer ácido nucleico que codifica una proteína que muestra actividad digestora de ADN bajo el control de una secuencia de señal para la secreción de la proteína digestora de ADN,

en el que dichos segundo y tercer ácidos nucleicos están operativamente unidos a un segundo promotor que es el mismo para ambos, y en el que ambos están unidos sobre el mismo constructo de ácido nucleico,

y en el que el segundo promotor es o bien

(i) inducible o

(ii) un promotor constitutivamente débil o un promotor con un nivel basal bajo que no requiere la adición de un inductor para funcionar como un promotor,

y en el que el primer promotor inducible y el segundo promotor son diferentes entre sí y, cuando el segundo promotor es un promotor inducible, responden a diferentes inductores;

(b) añadir un inductor específico para la inducción de la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo a partir del primer promotor inducible,

(c) únicamente cuando el cultivo se realiza mediante (a)(i) anterior, añadir un segundo inductor específico para el segundo promotor inducible tras la acumulación de aproximadamente 50% o más de la acumulación máxima del polipéptido heterólogo que se debe recuperar,

(d) lisar las células, y

(e) recuperar el polipéptido heterólogo acumulado del caldo lisado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido heterólogo es un polipéptido de mamífero.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el polipéptido heterólogo es el anticuerpo anti-CD18 o un fragmento del anticuerpo anti-CD18.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de recuperación se realiza utilizando sedimentación o adsorción de lecho expandido.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína digestora de ADN es una ADNasa eucariótica o endA bacteriana.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células bacterianas son células Gram-negativas.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la lisozima de fago es la lisozima de fago T4.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de recuperación tiene lugar en presencia de un agente que altera la pared celular exterior de las células bacterianas.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el agente es un agente quelante o zwitterión.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, previamente a la recuperación, se incuba el lisado celular durante un periodo de tiempo suficiente para liberar el polipéptido heterólogo contenido en las células.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que uno o más de los ácidos nucleicos, incluyendo el promotor del(de los) mismo(s), está(n) integrado(s) en el genoma de las células bacterianas.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cultivo tiene lugar en condiciones por las que el polipéptido heterólogo y la proteína digestora de ADN son secretados en el periplasma de las bacterias.

ES 2 318 070 T3

13. Bacteria que comprende

(a) un polipéptido heterólogo secretado en el periplasma de la bacteria;

5 (b) una proteína que muestra actividad digestora de ADN secretada en el periplasma de la bacteria, y

(c) una lisozima de fago en el citoplasma de la bacteria.

14. Bacteria según la reivindicación 13, que es una bacteria Gram-negativa, preferentemente *E. coli*.

10 15. Cultivo a gran escala de bacterias, en el que las bacterias se encuentran a una densidad celular de entre 15 g de peso seco/litro y 150 g de peso seco/litro, y en el que las bacterias son las bacterias según la reivindicación 13 ó 14.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

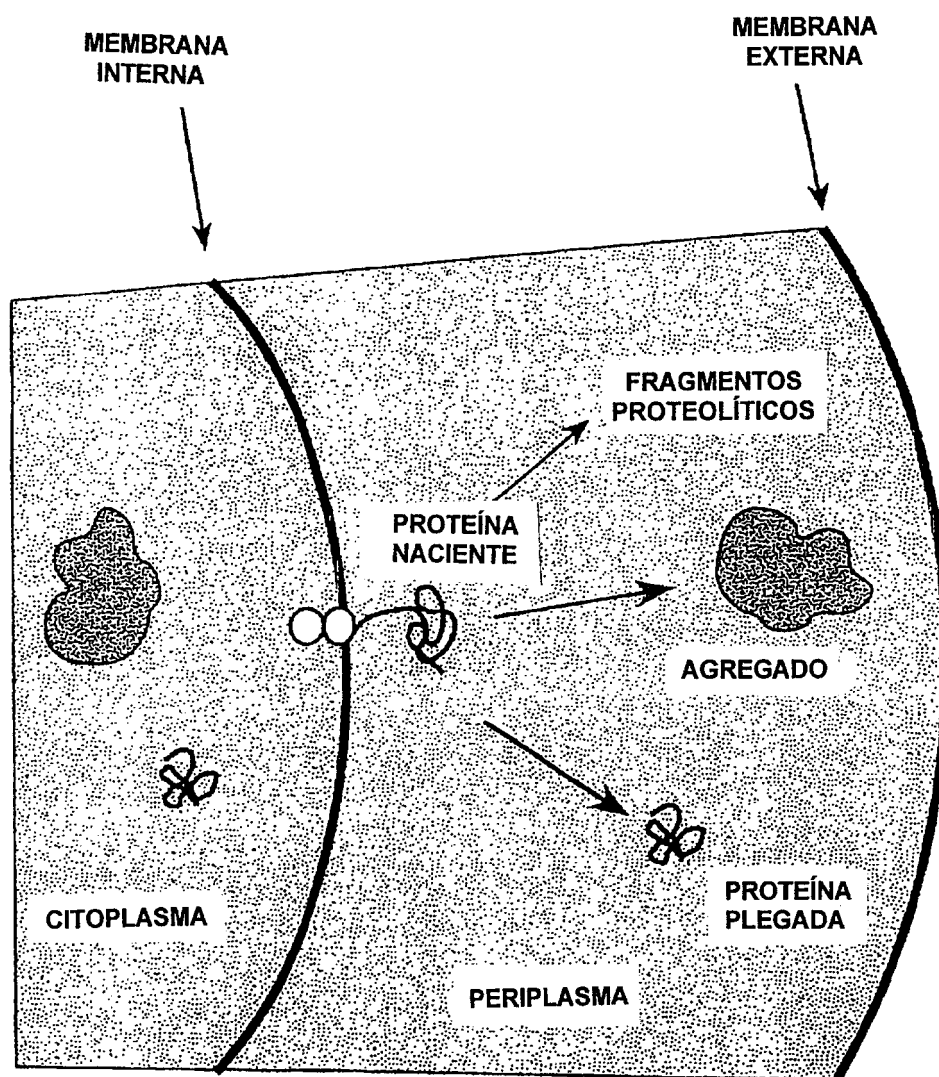


FIG. 1

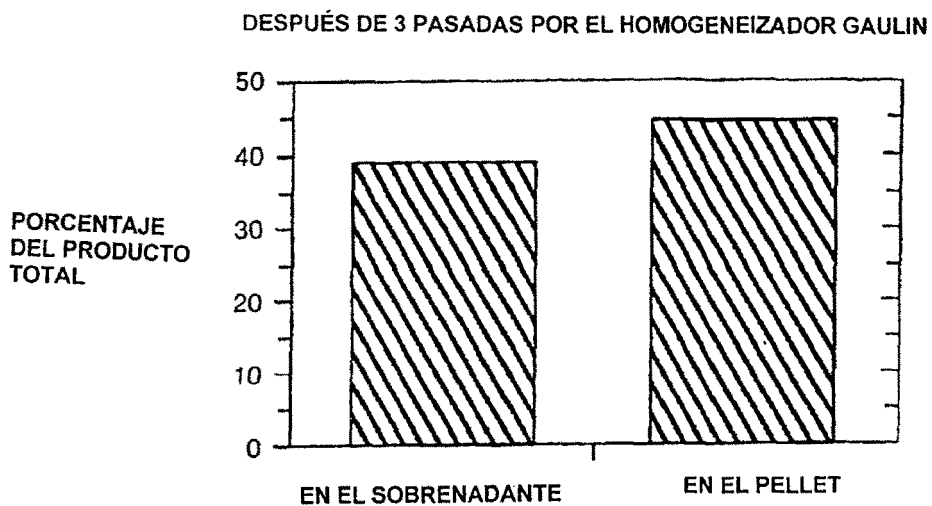


FIG._2

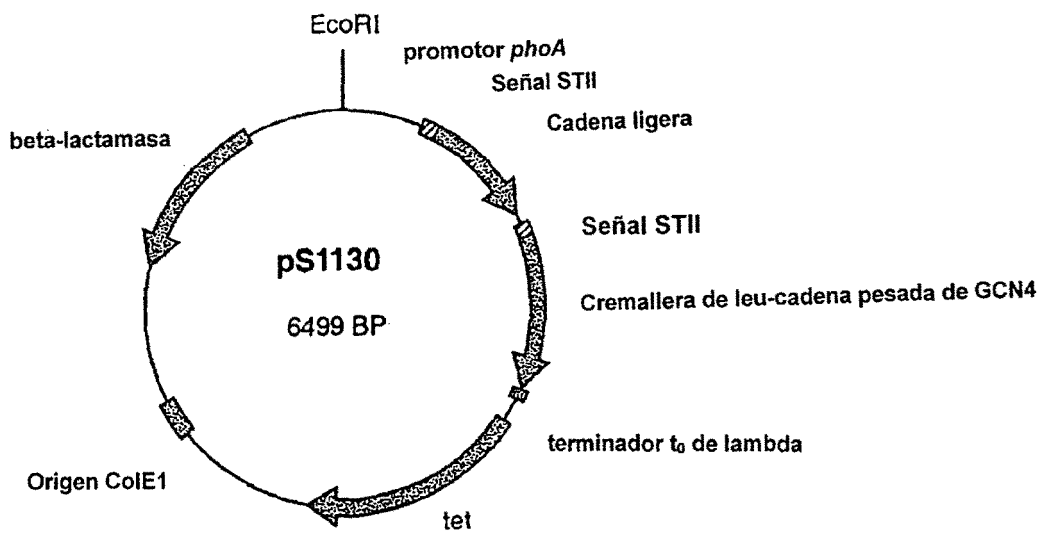


FIG._3

↑ Inicio del cassette de expresión

1 GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA
61 GTTGTATATT AAGCTTTGGA GATPATCGTC ACTGCAATGC TTGCGAATAT GGGCGAAAAT
121 GACCAACAGC GGTGATTGA TCAGGTAGAG GGGGGCTGT ACGAGGTAAA GCCCGATGCC
181 AGCATTCCCTG ACGACGATAC GGAGCTGCTG CGCGATTACG TAAAGRAGTT ATTGAAGCAT
241 CCTCGTCAGT AAAAAGTTAA TCTTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTTGTCAC GGCCGAGACT
301 TATAGTCGCT TTGTTTTTAT TTTTAAAGT ATTTGTAAC AGAATTGAG CTCGCCGGGG
361 ATCCTCTAGA GGTGAGGTG ATTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT CTT
-23 M K K N I A F L L
413 GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT ATC
-14 A S M F V F S I A T N A Y A D I
461 CAG ATG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG
3 Q M T Q S P S S L S A S Y G D R
509 GTC ACC ATC ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC AAC AAT TAT CTG AAC
19 V T I T C R A S Q D I N N Y L N
557 TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA CTA CTG ATT TAC TAT
35 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y
605 ACC TCC ACC CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC TCT GGT TCT GGT
51 T S T L H S G V P S R F S G S G

FIG.-4A-1

653 TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCG GAG GAC
 67 S G T D Y T L T I S S L Q P E D
 701 TTC GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA GGT AAT ACT CTG CCG CCG ACG TTC
 83 F A T Y Y C Q Q G N T L P P T F
 749 GGA CAG GGC ACG AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT
 99 G Q G T K V E I K R T V A A P S
 797 GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC
 115 V F I F P P S D E Q L K S G T A
 845 TCT GTT GTG TGC CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA
 131 S V Y C L L N N F Y P R E A K Y
 893 CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT
 147 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
 941 GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
 163 V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 989 CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC
 179 L T L S K A D Y E K H K Y Y A C
 1037 GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC
 195 E Y T H Q C G L S S P V T K S F N
 1085 AGG GGA GAG TGT TAA G CTGATCCTCT ACGCCGGAGC CATCGTGGCG
 211 R G E C

FIG._4A-2

1131 CTAGTACGCA AGTTCACGTA AAAACGGTAT CTAGAGGTTG AGGTGATTTT ATG AAA
-23 M K
1187 AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT
-21 K N I A F L L A S M F V F S I A
1235 ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGC GGT GGC CTG
-5 T N A Y A E V Q L V E S G G L
1283 GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA ACT TCT GGC TAC
12 V Q P G G S L R L S C A T S G Y
1331 ACC TTT ACC GAA TAC ACT ATG CAC TGG ATG CGT CAG GCC CCG GGT AAG
28 T F T E Y T M H W M R Q A P G K
1379 GGC CTG GAA TGG GTT GCA GGG ATT AAT CCT AAA AAC GGT GGT ACC AGC
44 G L E W V A G I N P K N G G T S
1427 CAC AAC CAG AGG TTC ATG GAC CGT TTC ACT ATA AGC GTA GAT AAA TCC
60 H N Q R F M D R F T I S V D K S
1475 ACC AGT ACA GCC TAC ATG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCT GAG GAC ACT
76 T S T A Y M Q M N S L R A E D T
1523 GCC GTC TAT TAT TGT GCT AGA TGG CGA GGC CTG AAC TAC GGC TTT GAC
92 A V Y Y C A R W R G L N Y G F D
1571 GTC CGT TAT TTT GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC
108 V R Y F D V W G Q G T L V T V S
1619 TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
124 S A S T K G P S V F P L A P S S

FIG.-4B-1

1667 AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC
140 K S T S G G T A A L G C L V K D
1715 TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
156 Y F P E P V T V S W N S G A L T
1763 AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC
172 S G V H T F P A V L Q S S G L Y
1811 TCC CTC AGC AGC GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG
188 S L S S V V T V P S S S L G T Q
1859 ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC
204 T Y I C N V N H K P S N T K Y D
1907 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCG CCG
220 K K V E P K S C D K T H T C P
1955 TGC CCA GCA CCA GAA CTG CTG GGC GGC ATG AAA CAG CTA GAG GAC
236 C P A P E L L G G R M K Q L E D
2003 AAG GTC GAA GAG CTA CTC TCC AAG AAC TAC CAC CTA GAG AAT GAA GTG
252 K V E E L L S K N Y H L E N E Y
2051 GCA AGA CTC AAA AAG CTT GTC GGG GAG CGC TAA GCATGCG ACGGCCCTAG
268 A R L K K L V G E R
2101 AGTCCCTAAC GCTCGGTTC CGCCGGGCGT TTTTATTGT TAA

FIG._4B-2

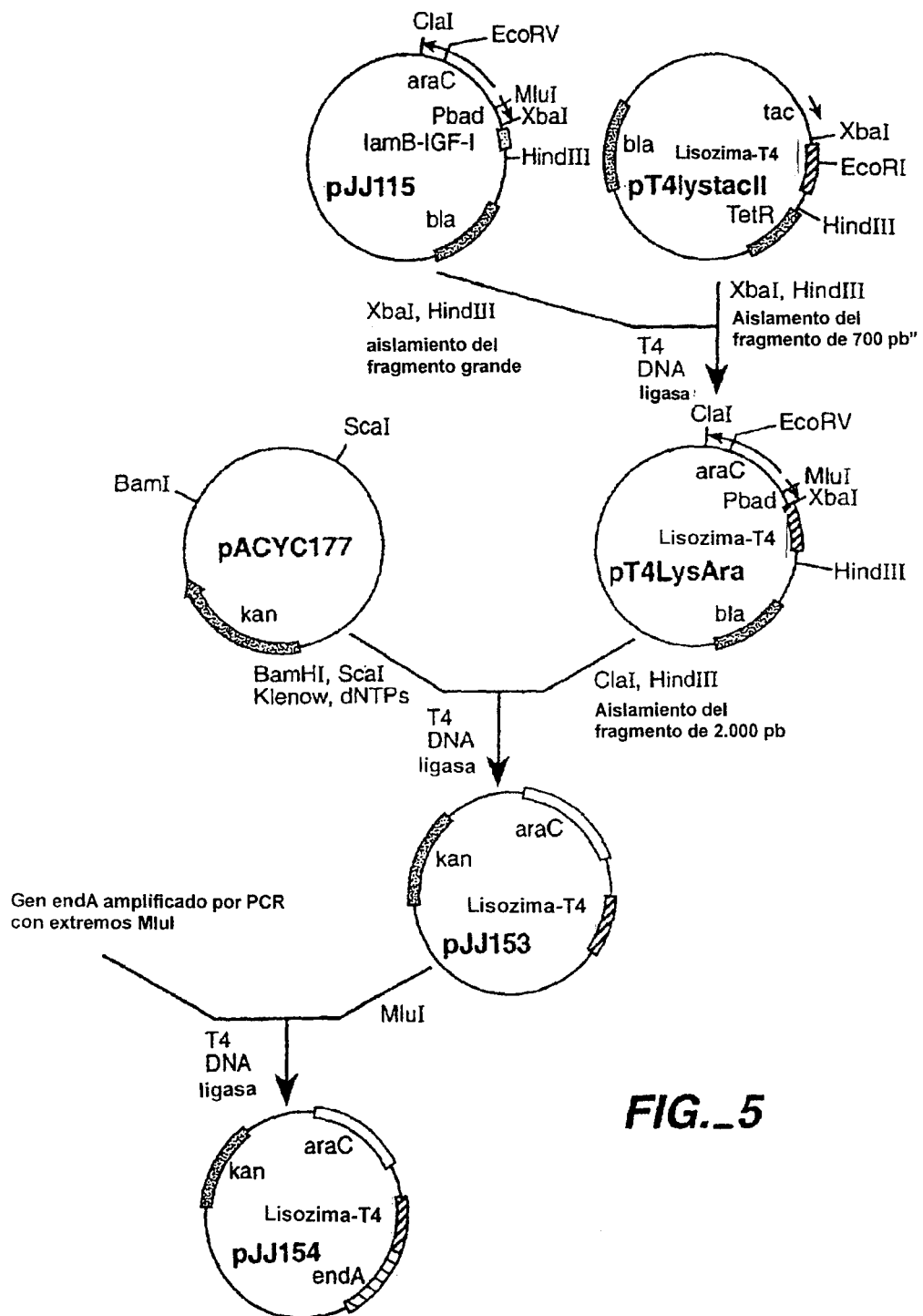
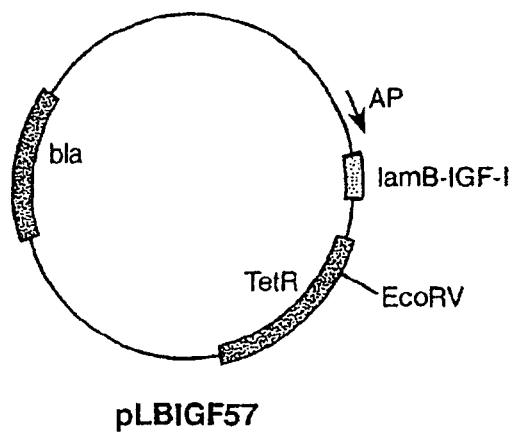


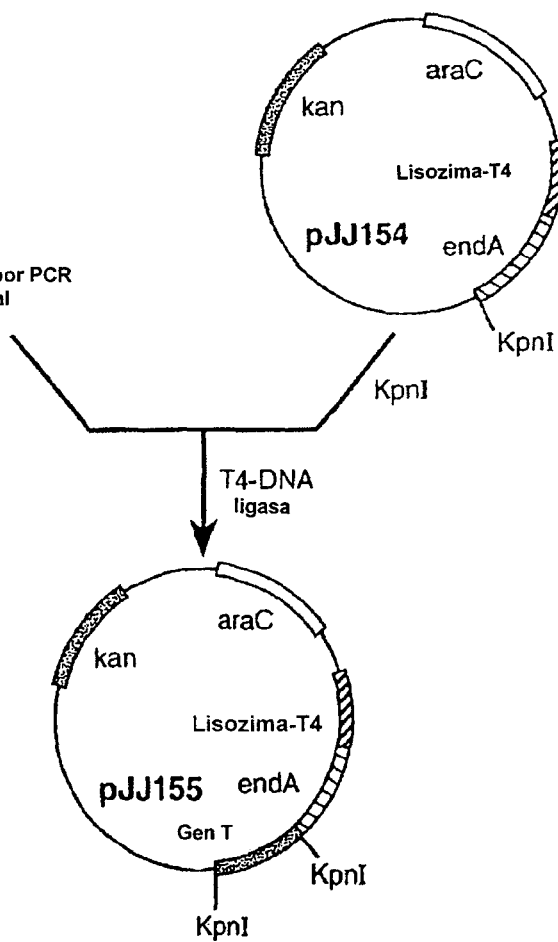
FIG. 5

FIG._6



Gen amplificado por PCR
con extremos KpnI

FIG._7



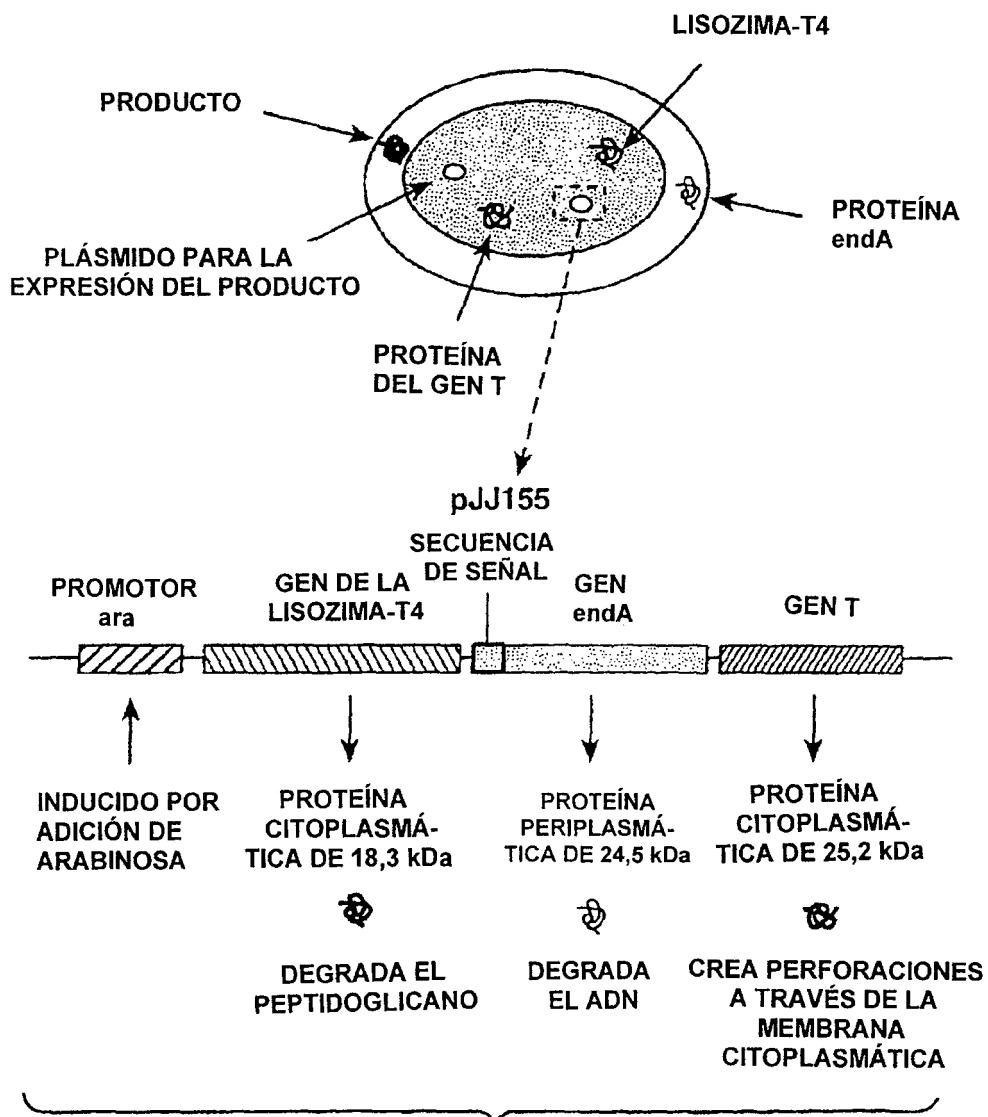


FIG. 8

PELLET RESUSPENDIDO DE CALDO CONTROL
ANTES DE LA ADICIÓN DE EDTA

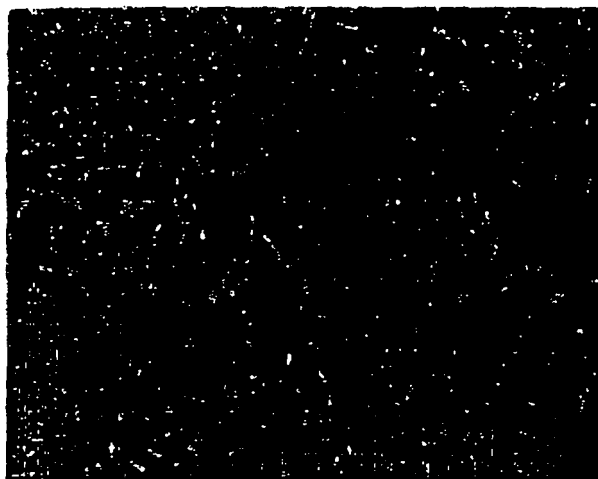


FIG._9A

PELLET RESUSPENDIDO DE CALDO CONTROL
DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE EDTA

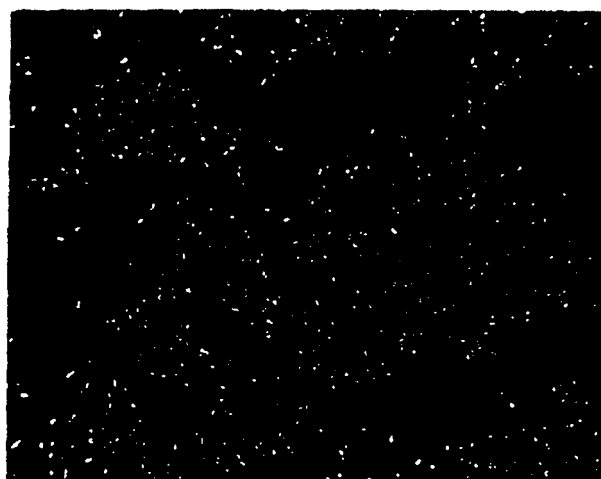
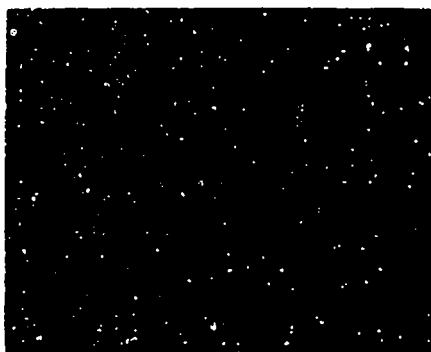


FIG._9B

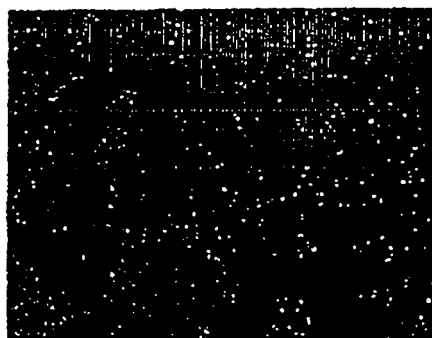
PRODUCTO DE FERMENTACIÓN DE CO-EXPRESIÓN
EN CALDO CON LISOZIMA-T4+endA+GEN-t. CALDO
COMPLETO-CALDO COMPLETO NO DILUIDO

FIG._9C



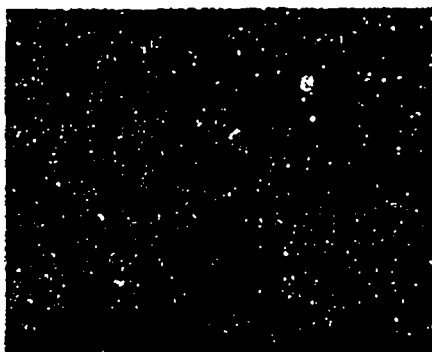
CO-EXPRESIÓN EN CALDO CON
LISOZIMA-T4+endA+GEN-t ANTES DE LA ADICIÓN
DE EDTA - PELLET RESUSPENDIDO

FIG._9D



CO-EXPRESIÓN EN CALDO CON
LISOZIMA-T4+endA+GEN-t DESPUÉS DE LA
ADICIÓN EDTA - PELLET RESUSPENDIDO

FIG._9E



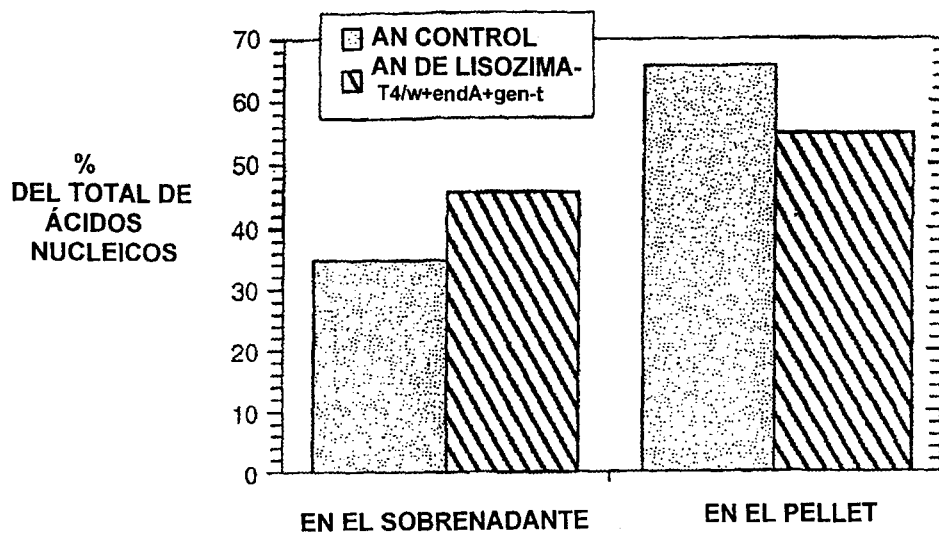


FIG._10A

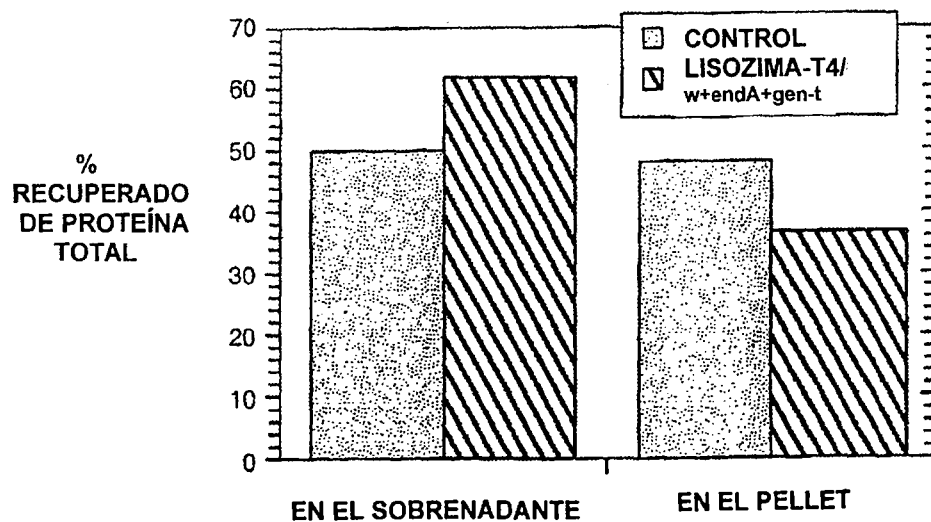


FIG._10B

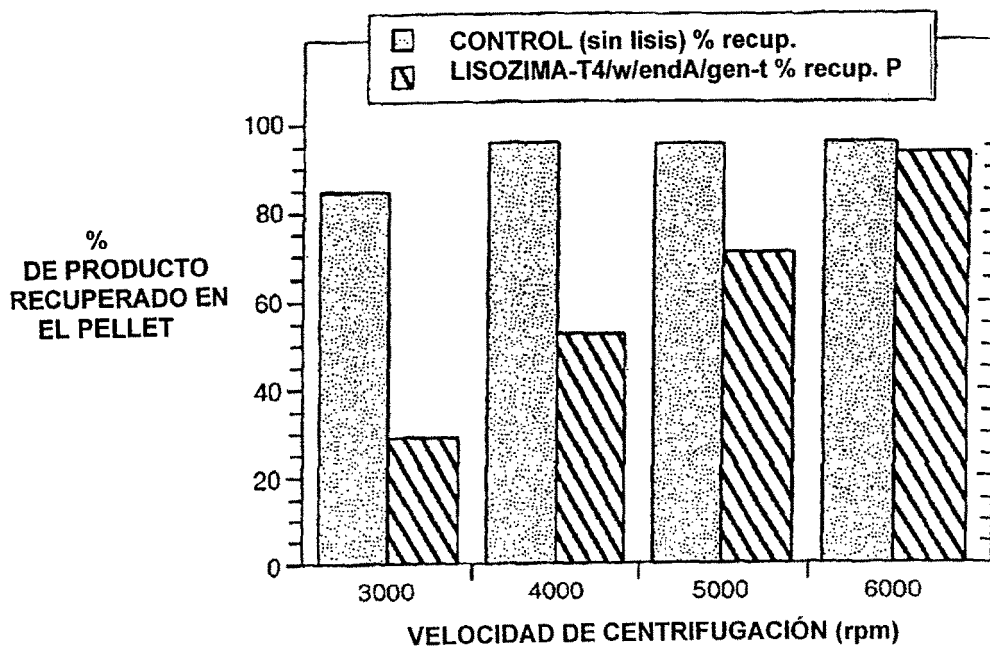


FIG. 11

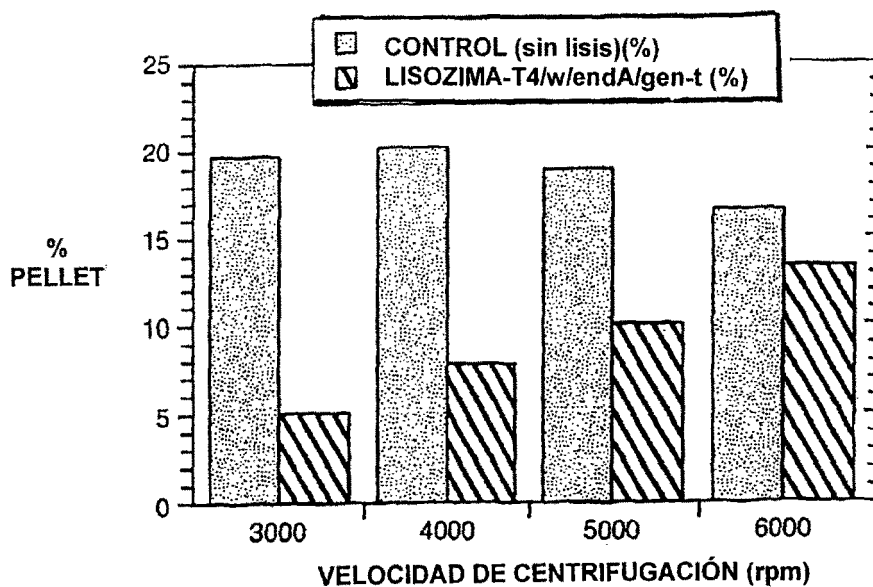


FIG. 12

ES 2 318 070 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

5 <120> PROCESO

<130> P1711R1PCT

10 <160> 3

<210> 1

<211> 6550

15 <212> ADN

<213> Humano

20 <400> 1

```
gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50
tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaaagaaga agagtogaat 100
gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150
tcgcaatag ggcgaanaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200
ggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250
gagctgctgc gcgattcctg aaagaagtta ttgaagcacc ctctgtagta 300
aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccagagactt 350
atagtcgctt tgtttttatt ttttaagtta ttgttaacta gaattcagac 400
tcgcccggga tcctctagag gttgaggtga ttttatgaaa aagaatatcg 450
cattctctct tgcctctatg ttctgttttt ctattgttac aaacgcgtac 500
gctgatatcc agatgaccca gtcccgcagc tcctctgctg cctctgtggg 550
cgatagggtc accatccact gtcgtgccag tcaggacacc aacaattatc 600
tgaactggta tcaacagaaa ccaggaaaag ctccgaaact actgatttac 650
tatacctcca cctccactc tggagtccct tctcgttctt ctggttctgg 700
ttctgggacg gattaccactc tgaccatcag cagctctcaa ccggaggact 750
tcgcaactta ttactgtcag caaggtaata ctctgccgc gacgttcgga 800
cagggcacga aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt 850
catctctccg ccactctgat agcagttgaa atctggaact gcctctgttg 900
tgtcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaa 950
gtggataacg ccttccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca 1000
ggacagcaag gacagcactt acagcctcag cagcacctcg acgctgagca 1050
aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 1100
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtaaac 1150
tgatcctcta cgccggacgc atcgtggcgc tagtacgcaa gttcacgtaa 1200
aaacggatc tagaggtga ggtgatttta tgaanaagaa tatcgattt 1250
```

60

65

ES 2 318 070 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

cttcttgcat ctatgttcgt ttttctatt gctacaaacg cgtacgctga 1300
ggttcagctg gtggagtctg gcggtggcct ggtgcagcca gggggctcac 1350
tccgtttgtc ctgtgcaact tctggctaca cctttaccga atacactatg 1400
cactggatgc gtcaggcccc gggtaaagggc ctggaatggg ttgcagggat 1450
taatcctaam aacggtggta ccagccacaa ccagaggttc atggaccgtt 1500
tcactataag cgtagatana tccaccagta cagcctacat gcaaatgaac 1550
agcctgcctg ctgaggacac tgccgtctat tattgtgcta gatggcgagg 1600
cctgaactac ggctttgacg tccgttattt tgacgtctgg ggtaaggaa 1650
ccttggctac cgtctctctg gctccacca agggcccacg ggtctcccc 1700
ctggcaccct cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccttgggctg 1750
cctggccaag gactacttec ccgaaccggg gacggtgctg tggaaactag 1800
gcgccctgac cagcggcctg cacacctec cggctgtcct acagtctca 1850
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg 1900
caccagacc tacatctgca acgtgaatca caagcccage aacaccaagg 1950
tcgacaagaa agttgagccc aaatcttggg acaaaactca cacatgcccg 2000
ccgtgccag caccagaact gctggggcgc cgcataaac agctagagga 2050
caaggtcgaa gagtactct ccaagaacta ccacctagag aatgaagtgg 2100
caagactcaa aaagcttgc ggggagcgt aagcatcgca cggccctaga 2150
gtccctaacg ctcggttgc gccggcgctt ttttattgtt aactcatgtt 2200
tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa 2250
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaal gcgctcatcg 2300
tcatcctcgg caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg cttggttatg 2350
ccggtactgc cgggcccctt gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc 2400
cagtcactat ggcgtgctgc tagcgtata tgcgttgatg caattctat 2450
ggcaccctgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggcgg ccgcccagtc 2500
ctgctcgtct cgtacttgg agccactate gactacgca tcatggcgac 2550
cacaccctgc ctgtggatcc tctacgccgg acgcatcgtg gccggcatca 2600
ccggcggcac aggtgcggtt gctggcgctt atatcgccga catcaccgat 2650
ggggaagatc gggctcgcca cttegggctc atgagcgtt gtttcggcgt 2700
gggtatggtg gcaggccccg tggccggggg actgttgggc gccatctctt 2750
tgcaacgacc attccttgcg gcggcggtgc tcaacggcct caacctacta 2800
ctgggtgctt tcctaagca ggaatcgcat aagggagagc gtcgtccgat 2850
gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccggtgg gcgcygggca 2900

ES 2 318 070 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgtg 2950
ggacagggtg cggcagcgct ctgggtcatt ttcggcgagg accgctttcg 3000
ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgct tgcggtattc ggaatcttgc 3050
acgccctcgc tcaagccttc gtcactggtc ccgccacca acgcttcggc 3100
gagaagcagg ccattatcgc cggcatggcg gccgacgcgc tgggctaegt 3150
cttgetggcg ttcgcgacgc gaggtggat ggcttcccc attatgattc 3200
ttctcgcttc cggcggcatc gggatgccc cgttgcaggc catgctgtcc 3250
aggcaggtag atgacgacca tcagggacag ctccaaggat cgctcgcggc 3300
tcttaccagc ctaacttcga tcaactggacc gctgatcgtc acggcgattt 3350
atgccgcctc ggcgagcaca tggaacgggt tggcatggat tgtaggcgcc 3400
gccctatacc ttgtctgcct ccccgcggtg cgtcgcggtg catggagcgg 3450
ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg cacctcgcta acggattcac 3500
cactccaaga attggagcca atcaattctt gggagaact gtgaatgcgc 3550
aaaccaacce ttggcagaac atatccatcg cgtccgccat ctccagcagc 3600
cgcacgcggc gcattctcggg cagcgttggg tccctggcac ggtgctgat 3650
gatcgtgctc ctgtcgttga ggaccggct aggctggcgg ggttgcctta 3700
ctggttagca gaatgaatca ccgatcgcg agcgaacgtg aagcgaactg 3750
tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt 3800
ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc tgeaccatta 3850
tgttccgat ctgcacgcga ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct 3900
acatctgtat taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga tttttctctg 3950
gtcccgccgc atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttccagta 4000
accgggcctg ttcacatca gtaaccgta tegtgagcat cctctctcgt 4050
ttcateggta tcattacccc catgaacaga aattccccct tacacggagg 4100
catcaagtga ccaaacaggg aaaaaccgcc cttaacatgg cccgctttat 4150
cagaagccag acattaacgc tcttgagaaa actcaacgag ctggacgcgg 4200
atgaacagcg agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt 4250
taccgcagct gcctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca 4300
catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaaagcg gatgccggga 4350
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc 4400
gcagccatga cccagtcacg tagcgtatgc ggagtgtata ctggcttaac 4450
tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 4500
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgtcttccg 4550
  
```

ES 2 318 070 T3

5 cttcctegct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcgget gggcgagcg 4600
 gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcaggggg 4650
 taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 4700
 gtaaaaaggc cgcgttgctg cgcgttttcc ataggctccg cccccctgac 4750
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 4800
 actataaaga taccagggct tccccctgg aagetccctc gtgcgctctc 4850
 10 ctgttccgac cctgcccctt accggatacc tgcgcgctt tctcccttcg 4900
 ggaaagctgg cgccttttca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgg 4950
 gtaggtcgtt cgcctcaagc tgggctgtgt gcacgaacce cccgttcagc 5000
 ccgaccctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccocgta 5050
 15 agacacgact tctcgcact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 5100
 agcgaggat gtagggcgtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5150
 acggctacac tagaaggaca gtatttggtt tctgcgctct gctgaagcca 5200
 20 gttaccctcg gaaaaagagt tggtagctct tgatcccgca aacaaaccac 5250
 cgttggtagc ggtggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 5300
 aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct 5350
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaa 5400
 25 aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 5450
 tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaate 5500
 agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc 5550
 30 ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccactcg 5600
 gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat 5650
 ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc 5700
 tgcaacttta tccgcctcca tccagtetat taattgttgc cgggaaagcta 5750
 35 gagtaagtag ttcgccagt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 5800
 gcaggcatcg tgggtgcacg ctgcgtcgtt ggtatggctt cattcagctc 5850
 cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa 5900
 40 aagcggtag ctccttcggt cctccgacg ttgtcagaag taagttggcc 5950
 gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 6000
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt 6050
 cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca 6100
 45 acacgggata ataccgccc acatagcaga actttaaag gtctcatcat 6150
 tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga 6200

 50 gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct 6250
 cttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc 6300
 cgcaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgtgaaata ctcatctct 6350
 tcctttttca atattactga agcatttacc aggttattg tctcatgagc 6400
 55 ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 6450
 cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattacca 6500
 tgcattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaaggccctt tcgcttcaa 6550

60 <210> 2
 <211> 537
 <212> PRT
 65 <213> Humano

ES 2 318 070 T3

<400> 2

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
 1 5 10 15
 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 5 20 25 30
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 35 40 45
 Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 10 50 55 60
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser
 65 70 75
 Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 80 85 90
 Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 15 95 100 105
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
 110 115 120
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 125 130 135
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 140 145 150
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 155 160 165
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 170 175 180
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 185 190 195
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 200 205 210
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 215 220 225

ES 2 318 070 T3

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Met Lys Lys 230 235 240
 Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala 245 250 255
 Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 260 265 270
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser 275 280 285
 Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Met Arg Gln Ala 290 295 300
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Asn Pro Lys Asn 305 310 315
 Gly Gly Thr Ser His Asn Gln Arg Phe Met Asp Arg Phe Thr Ile 320 325 330
 Ser Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Met Asn Ser 335 340 345
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Arg 350 355 360
 Gly Leu Asn Tyr Gly Phe Asp Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly 365 370 375
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 380 385 390
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 395 400 405
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro 410 415 420
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 425 430 435
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser 440 445 450
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 455 460 465
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 470 475 480
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 485 490 495
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Arg Met Lys Gln Leu Glu 500 505 510
 Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn 515 520 525
 Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg 530 535 537

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Leu Leu Gly Gly
 1 5 10 11