



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 641**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05726252 .9**

96 Fecha de presentación : **26.01.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1711603**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: ***Saccharomyces cerevisiae* transformada y método para la producción en masa de la proteína LK8 utilizando la misma.**

30 Prioridad: **27.01.2004 KR 10-2004-0005033**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2011

73 Titular/es: **MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE
341 Bojung-ri, Goosung-eup
Yongin city, Gyunggi-do 449-910, KR**

72 Inventor/es: **Lim, Hyung-Kwon;
Park, Jung Hwan y
Kim, Sung-Geun**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 356 641 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

Saccharomyces cerevisiae transformada y método para la producción en masa de la proteína Lk8 utilizando la misma

Sector técnico

5 La presente invención hace referencia a un método para preparar proteína LK8, más particularmente, a un método para la producción en masa de proteína LK8 utilizando *Saccharomyces cerevisiae* transformada con un gen que codifica la proteína LK8 que posee actividad inhibidora de la angiogénesis.

Estado de la técnica

10 La angiogénesis es un proceso biológico que proporciona nuevos vasos a órganos o tejidos. Particularmente, se generan nuevos capilares sanguíneos a partir de microvasos preexistentes, que están en proceso de crecimiento para transformarse en vasos sanguíneos. La angiogénesis, como proceso fisiológico normal, solamente se observa en situaciones concretas en el cuerpo humano, por ejemplo durante el desarrollo fetal y embrionario, durante la maduración del útero, durante la proliferación de la placenta, durante la formación del cuerpo lúteo y para la curación de heridas. Incluso en estos casos, la angiogénesis está regulada de forma precisa y se detiene una vez ha finalizado su función. La angiogénesis se encuentra regulada de forma estricta por un factor regulador de la angiogénesis (Folkman, J. Nature Med 1: 27-31, 1995) y el fenotipo de angiogénesis parece ser diferente según el equilibrio existente entre el incremento de la expresión de un factor estimulador de la angiogénesis y la disminución de la expresión de un factor inhibidor de la angiogénesis.

Aunque el proceso de angiogénesis es muy complicado y sofisticado, puede describirse del siguiente modo. En primer lugar, se transmite un estímulo para la angiogénesis a un vaso preexistente, dando lugar a la expansión del vaso sanguíneo y al incremento de la permeabilidad de la membrana. En segundo lugar, la fibrina sale del vaso expandido y a continuación se acumula en el citosol alrededor del vaso sanguíneo. En tercer lugar, se activa un enzima para descomponer la membrana basal del vaso preexistente. En cuarto lugar, se destruye la membrana basal de manera que las células endoteliales salen del vaso sanguíneo y proliferan en el citosol existente alrededor y a continuación vuelven a desplazarse. En último lugar, dichas células endoteliales se alinean formando un vaso, dando lugar a un nuevo vaso sanguíneo.

30 Son ejemplos de enfermedades relacionadas con la angiogénesis las enfermedades inflamatorias incluyendo las artritis, las enfermedades oculares incluyendo la retinopatía diabética, las enfermedades dermatológicas incluyendo la psoriasis y el cáncer que es la enfermedad relacionada con la angiogénesis más representativa de entre todas las enfermedades (Folkman, J., Nature Med., 1:27-31, 1995). En concreto, la angiogénesis es esencial para el crecimiento de los tumores primarios y metastáticos (Folkman, J., New Engl. J. Med., 285:1182-1186, 1971; Folkman, J., J. Biol. Chem., 267:10931-10934, 1992). Ello significa que un tumor no puede crecer cuando se inhibe o detiene la angiogénesis, lo cual indica que la inhibición de la angiogénesis podría ser una forma eficaz de tratamiento a largo plazo de tumores.

40 Por lo tanto, se requiere de forma urgente el desarrollo de nuevos inhibidores de la angiogénesis para inhibir o detener la misma y además proporcionar dichos inhibidores al usuario a precios moderados resultantes de una producción en masa efectiva de los mismos.

Los inhibidores de la angiogénesis se consideran como uno de los métodos de tratamiento más favorables para el cáncer pues se dirigen a los vasos sanguíneos que suministran nutrientes al tumor, en lugar de atacar directamente las células cancerosas, lo cual supone que se reduce la resistencia contra dichos fármacos. Se ha comprobado la eficacia de diversos inhibidores para inhibir la angiogénesis de tumores, tales como los inhibidores naturales hallados in vivo, los inhibidores integrina, los inhibidores de la señal de transducción y los inhibidores de la proteólisis, y se están ensayando clínicamente (Brower, V., Nat. Biotechnol., 17:963-8, 1999; Carmeliet, P. y Jain, R. K., Nature 407:249-57, 2000). Entre estos inhibidores ensayados clínicamente, es conocido que LK6, LK7 y LK8, que son las subunidades kringle 36a, 37a y 38a de la apolipoproteína humana Apo(a), mencionadas en la publicación de patente internacional WO 01/19868 poseen actividad inhibidora de la angiogénesis conjuntamente con actividades inhibidoras del crecimiento y la migración de las células epiteliales. Especialmente, la proteína LK8 muestra la actividad más elevada. Para proporcionar precios moderados para la producción de la proteína LK8 para examinar los efectos de la proteína, realizar ensayos clínicos y para su utilización comercial, es esencial el desarrollo de un método de producción en masa de proteína LK8 mediante el cultivo de cepas recombinantes transformadas con el gen LK8.

Por lo tanto, los presentes inventores han estudiado las funciones de la proteína LK8 y el método para la utilización comercial efectiva de dicha proteína. En último término, los presentes inventores han preparado *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes transformando la levadura *Saccharomyces*

cerevisiae con un vector plásmido que contiene el gen LK8 o insertando el gen LK8 dentro de un cromosoma huésped, y a continuación han seleccionado las cepas productoras en masa de la proteína LK8. Los presentes inventores también han determinado las condiciones óptimas de cultivo para el crecimiento de las cepas y finalmente han completado la presente invención confirmado que puede bajo dichas condiciones puede producirse en masa proteína LK8 de alta calidad.

Descripción de la invención

Problema técnico

Es un objetivo de la presente invención el dar a conocer un método de preparación de una cepa de levadura transformada capaz de producir en masa proteína LK8, un inhibidor de la angiogénesis, y un método para la producción en masa de la proteína LK8 mediante el cultivo de dicha cepa.

Solución técnica

Para conseguir el objetivo citado, en la presente invención se da a conocer el vector de expresión recombinante MδLK8 que contiene el casete de expresión de LK8 formado por un promotor, una secuencia de secreción, el ADNc de LK8 representado por el identificador de secuencia nº 1 y un terminador, es este orden.

También se describe una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada preparada transfectando una cepa huésped con dicho vector recombinante.

Adicionalmente se da a conocer un método para la preparación de un transformante con un nivel elevado de expresión de proteína LK8, que comprende las etapas siguientes: (1) transformar una cepa huésped con el vector recombinante previamente mencionado; (2) cultivar el transformante preparado en la etapa 1 tras tratamiento con el antibiótico G418 sulfato; y (3) detectar los transformantes con niveles elevados de expresión de LK8 mediante inmunoensayo.

También se describe un método para la producción en masa de la proteína LK8, que comprende las etapas siguientes: (1) preparar una cepa transformada mediante la inserción del vector de expresión recombinante con el gen LK8, MdLK8, en una cepa huésped, (2) cultivar por siembra la cepa transformada preparada en la etapa 1 y proceder al cultivo discontinuo de la cepa en un medio líquido que contiene glucosa y galactosa como fuente de carbono, manteniendo el oxígeno disuelto estable mediante la regulación del suministro de aire y la velocidad de agitación; (3) proceder al cultivo semicontinuo ("fed-batch") de la solución de cultivo de la etapa 2 en un medio líquido que contiene galactosa como fuente de carbono; y (4) purificar la proteína LK8 a partir de la solución de cultivo de la etapa 3.

La invención se define mediante las reivindicaciones.

De aquí en adelante, se describe la presente invención de forma detallada.

En la presente invención, se da a conocer el vector de expresión recombinante MδLK8 que contiene el casete de expresión de LK8 formado por un promotor, una secuencia de secreción, el ADNc de LK8 representado por el identificador de secuencia nº 1 y un terminador, en este orden, la secuencia δ para la inserción múltiple del casete de expresión de LK8 dentro del cromosoma de la cepa huésped, y el gen de resistencia a la neomicina (neo) para la selección tras la inserción múltiple. En una realización preferente del vector de expresión recombinante MδLK8 de la presente invención, dicho promotor es el promotor GAL1. En una realización preferente de la presente invención dicha secuencia de secreción es la señal de secreción del factor α representada por el identificador de secuencia nº 2. En otra realización preferente de la presente invención, dicho terminador es el terminador CYC1.

Particularmente, en la presente invención, el fragmento de ADN que contiene la señal de secreción del factor-α y el ADNc de LK8 se obtuvieron mediante tratamiento con un enzima de restricción del vector de expresión pMBRI-LK8 (Publicación de patente coreana nº: 2004-0069840) que solía utilizarse para la producción de proteína LK8 en cepas de la levadura *Pichia pastoris* (ver figura 1). El fragmento de ADN se insertó en el vector p426GAL1 para construir el vector de expresión pMCLK8 (6,9 kb) disponible para la producción del casete de expresión de LK8 recombinante en cepas de levadura (ver figura 2). A continuación, se construyó el vector de expresión recombinante MδLK8 (ver figura 5) para insertar el casete de expresión recombinante LK8 que contiene un promotor, una secuencia de secreción, la secuencia del ADNc de LK8 y un terminador, dentro del cromosoma de la levadura, seguido de la inserción múltiple.

La presente descripción también da a conocer una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada preparada mediante la transfección de una cepa huésped con el vector de expresión recombinante previamente mencionado. En una realización preferente de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada de la presente invención, dicha cepa huésped se selecciona del grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501, *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, *Saccharomyces cerevisiae*

CEN.PK2-1D y *Saccharomyces cerevisiae* 2805. En una realización más preferente de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada de la presente invención, dicha cepa huésped es *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501.

En este caso, una cepa huésped, *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501, se transformó mediante la transfección con un vector de expresión recombinante que contenía el gen LK8 y a continuación se seleccionaron las cepas de levadura transformadas que poseían específicamente varios genes LK8 en sus cromosomas. La cepa que sobre-expresaba la proteína LK8 se seleccionó mediante inmunotransferencia de colonias, transferencia puntual ("dot-blotting") y ELISA (enzimoinmunoanálisis) y a continuación se denominó *Saccharomyces cerevisiae* BJ350/MδLK8#36 (ver figura 6 y figura 7). La cepa se depositó en la Colección coreana de cultivos tipo del Instituto coreano de investigación en ciencias biológicas y biotecnología ((#52, Aeun-dong yousung-ku, Daejeun, Corea) el 13 de enero de 2004 (nº de orden: KCTC 10582BP).

La presente descripción da a conocer adicionalmente un método para la preparación de un transformante que expresa niveles elevados de proteína LK8, que comprende las etapas siguientes: (1) transformar una cepa huésped con el vector recombinante previamente mencionado; (2) cultivar el transformante preparado en la etapa 1 tras tratamiento con el antibiótico G418 sulfato; y (3) seleccionar los transformantes con niveles elevados de expresión de LK8 mediante inmunoensayo. En la etapa 2, el antibiótico no queda limitado a G418 sulfato, pero la cepa se trató preferentemente con entre 5 y 20 g/L de G418 sulfato. En la etapa 3, el método de selección no queda limitado a un tipo específico de inmunoensayo, pero son preferentes la inmunotransferencia de colonias, el ensayo de transferencia puntual o el ELISA (enzimoinmunoanálisis). También es preferente realizar la etapa 3 previamente mencionada varias veces, y de forma más preferente se realiza la inmunotransferencia de colonias para la selección primaria y a continuación se realiza la transferencia puntual para la segunda selección a partir de las cepas seleccionadas en la selección primaria y finalmente se realiza un ELISA para la selección final a partir de las cepas seleccionadas en la segunda selección.

Cuando LK8 se expresa en una cepa de levadura transformada que contiene en su cromosoma múltiples copias del gen LK8, preparada mediante el método de la presente invención, la secreción de la proteína LK8 se duplica o triplica, en comparación con la expresión episómica convencional en la cual un gen extraño es introducido en forma de episoma para expresar y secretar la proteína extraña.

La presente descripción también da a conocer un método para la producción en masa de la proteína LK8 que comprende las etapas siguientes: (1) preparar una cepa transformada mediante la inserción de un vector de expresión que expresa el gen LK8 en la cepa huésped, (2) cultivar por siembra la cepa transformada preparada en la etapa 1 y proceder al cultivo discontinuo de la cepa en un medio líquido que contiene glucosa y galactosa como fuente de carbono, manteniendo el oxígeno disuelto estable mediante la regulación del suministro de aire y la velocidad de agitación; (3) proceder al cultivo semicontinuo de la solución de cultivo de la etapa 2 en un medio líquido que contiene galactosa como fuente de carbono; y (4) purificar la proteína LK8 a partir de la solución de cultivo de la etapa 3.

A continuación se describe de forma más precisa el método para la producción en masa de la proteína LK8 etapa por etapa.

En una realización preferente del método, dicha etapa 1 es para la preparación de una cepa transformada resultada de la inserción del vector de expresión recombinante que expresa el gen LK8 en la cepa huésped. De forma más particular, se introduce un vector recombinante que contiene el casete de expresión de LK8 en la cepa huésped, de manera que se induce la expresión o la secreción del gen LK8 en un plásmido. A continuación, se realiza la inserción múltiple del gen LK8 y de la secuencia de secreción en el cromosoma de la cepa. Se selecciona la cepa que muestra la mejor expresión/selección, la cual es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada.

En la etapa 2 del método, la cepa transformada de la etapa 1 descrita se cultiva por siembra, y a continuación se procede al cultivo discontinuo en un medio líquido que contiene glucosa y galactosa como fuente de carbono, durante el cual el oxígeno disuelto se mantiene estable, mediante la regulación del suministro de aire y/o la velocidad de agitación. En este punto, el tamaño preferente del inóculo de la solución de cultivo por siembra es de entre el 5 y el 10% (peso/volumen). El cultivo discontinuo se realiza preferentemente con un suministro de aire entre 1 y 3 vvm (volumen por volumen por minuto) (5-80 L/minuto) y/o con una velocidad de agitación entre 200 y 1000 rpm, en un medio líquido que contiene entre un 1 y un 5% (peso/volumen) de glucosa y entre un 1 y un 5% (peso/volumen) de galactosa como fuente de carbono, en el que el oxígeno disuelto se ajusta entre un 40% y un 90% del oxígeno disuelto máximo. En este punto, el medio líquido puede incluir adicionalmente entre 1 y 50 g/L de extracto de levadura, entre 1 y 10 g/L de ácido casamino, entre 0,1 y 5 g/L de uracilo y entre 0,1 y 5 g/L de histidina.

En una realización preferente del método, dicha cepa de levadura transformada se distribuye en cientos o miles de viales de almacenamiento esterilizados. Se almacena bajo las mismas condiciones, constituyendo un sistema de banco celular de trabajo construido para mantener y controlar la cepa de

manera que pueda utilizarse como la misma semilla en cada cultivo por siembra para la producción de la proteína recombinante.

En la etapa 2, se realiza dicho cultivo por siembra durante 24 horas para asegurar la cantidad necesaria de células a partir del sistema de banco de pocillos de trabajo. La etapa de cultivo discontinuo de la presente invención es la etapa de crecimiento celular, durante el cual se incrementa el número de células y éstas se adaptan a un agente de inducción de la expresión, la galactosa. En la etapa final del cultivo discontinuo, se disminuye el oxígeno disuelto debido a la respiración vigorosa de las células. Para evitar la disminución del oxígeno disuelto, deben regularse el suministro de aire y la velocidad de agitación hasta que se finaliza el cultivo discontinuo para mantener el oxígeno disuelto por encima del 40%.

La etapa 3 del método es el cultivo semicontinuo de la solución de cultivo de la etapa 2 en un medio de cultivo líquido que contiene galactosa como fuente de carbono. En este punto, el oxígeno disuelto debe mantenerse entre el 20 y el 80% del oxígeno máximo disuelto, y el medio líquido incluye preferentemente entre un 20 y un 50% (peso/volumen) de galactosa como fuente de carbono. También es preferente regular la velocidad de suministro de galactosa para mantener el contenido en galactosa en el medio entre un 0,5% y un 5% (peso/volumen). El medio líquido puede incluir adicionalmente entre 1 y 50 g/L de extracto de levadura, entre 1 y 30 g/L de peptona, entre 0,1 y 5 g/L de uracilo y entre 0,1 y 5 g/L de histidina.

El suministro de galactosa se controla desde el inicio del cultivo semicontinuo para mantener un contenido estable de galactosa en el medio. Es decir, el contenido en galactosa en el medio se mantiene por debajo del 5% (peso/volumen) añadiendo galactosa si es necesario, para lo cual debe analizarse el oxígeno disuelto a lo largo del cultivo, y como resultado, se incrementa la expresión de la proteína LK8. A partir del cultivo semicontinuo, pueden obtenerse varios cientos de miligramos de proteína LK8 por litro de sobrenadante de cultivo (ver figura 8 y figura 9).

La etapa 4 del método es la purificación de la proteína LK8 a partir de la solución de cultivo de la etapa 3 descrita. La proteína LK8 es una molécula hidrofílica que posee un peso molecular entre 9 y 10 kD. Posee característicamente una baja solubilidad en pH neutro. Durante su expresión en solución de cultivo, pueden generarse derivados que poseen un peso molecular inferior a superior a la proteína LK8. Por lo tanto, para separar la proteína LK8 pura de la solución de cultivo, se requieren procesos de purificación que exploten las características físico-químicas de la proteína LK8.

Para la purificación de la proteína LK8, puede utilizarse cualquier proceso de purificación de proteínas convencional sin limitación, aunque es preferente la cromatografía. Es más preferente que la cromatografía incluya una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de interacción hidrofóbica (ver figuras 10 a 13). En una realización preferente del método de la presente invención, dicha cromatografía de intercambio iónico en una cromatografía de intercambio catiónico, y la elución de la proteína LK8 se realiza preferentemente a partir de una solución de elución que contiene entre 0 y 5 M de NaCl a un pH entre 4,0 y 8,0. En el caso de que se utilice una cromatografía de interacción hidrofóbica, la elución de la proteína LK8 se realiza preferentemente con una solución de elución de fosfato sódico 100 mM que contiene entre 0,1 y 5 M de sulfato amónico y entre 0 y 500 mM de NaCl a un pH entre 4 y 8.

Particularmente, en una realización más preferente del método, la proteína LK8 se une a una resina de intercambio catiónico mediante una cromatografía de intercambio catiónico, eliminándose a continuación las impurezas regulando el pH o la salinidad. Se realiza la elución de la proteína LK8 a una concentración adecuada. En este punto, el nivel de pH y la concentración salina dependen del tipo de resina de intercambio catiónico. En una realización preferente del método de la presente invención, se utiliza una resina de intercambio iónico fuerte de SP (sulfopropil). Se entenderá generalmente entre los que se dedican a este campo que cuando se utiliza una cromatografía de intercambio catiónico fuerte, el lavado y elución de la proteína LK8 se realizará con una concentración de sal elevada y a un pH elevado debido a su unión iónica fuerte, en comparación con la cromatografía de intercambio catiónico débil. Por lo tanto, la presente invención no queda limitada a las realizaciones que utilizan resinas de intercambio iónico de SP (sulfopropil) y las condiciones de tampón, sugiriendo que la invención puede incluir cualquier proceso de purificación que utilice resinas de intercambio catiónico convencionales para concentrar LK8 tras eliminar las impurezas unidas a la misma.

En una realización preferente del método, la muestra resultante purificada con dicha cromatografía de intercambio catiónico se purifica de forma adicional mediante cromatografía de interacción hidrofóbica. De forma más precisa, la proteína LH8 hidrofílica de la muestra se une a una resina hidrofóbica bajo una concentración salina elevada, y a continuación se eliminan las impurezas disminuyendo la concentración salina, seguido de la elución de la proteína LK8 a una concentración salina adecuada. Se eliminan las impurezas altamente hidrofóbicas a una concentración salina más baja que la concentración salina adecuada para la elución. En general, la cromatografía de interacción hidrofóbica se utiliza para la purificación de proteína hidrofóbica. En este punto, las impurezas restantes que no pueden eliminarse mediante resinas de intercambio catiónico deben eliminarse explotando las características

hidrofóbicas, mediante lo cual la proteína LK8 purificada puede producirse en masa. Sin embargo, el alcance de la presente invención no queda limitado por la resina de interacción hidrofóbica y las condiciones de tampón previamente mencionadas. La presente invención incluye procesos de purificación posibles para eliminar impurezas de la proteína LK8 utilizando resinas de interacción hidrofóbica convencionales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía de una electroforesis en gel de agarosa que muestra el fragmento de ADN del promotor GAL1 (6,4 kbp) y el fragmento de ADN (500 bp) que contiene MAT α (señal de secreción del factor- α) representado por el identificador de secuencia n°: 2 y el ADNc de LK8 representado por el identificador de secuencia n°: 1 preparados mediante tratamiento con los enzimas de restricción EcoR I y BamH I del vector de expresión pMBRI-LK8.

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra el mapa de escisión del vector de expresión pMCLK8 (6,9 kb) construido mediante la inserción de un fragmento de ADN que contiene la señal de secreción del factor- α (MAT α) representado por el identificador de secuencia n°: 2 y el ADNc de LK8 representado por el identificador de secuencia n°: 1, el cual está disponible para la producción de proteína LK8 recombinante en levaduras, entre el promotor GAL1 y el terminador CYC1 del vector p426GAL1.

La figura 3 es un grupo de gráficos que muestra los resultados de la cromatografía líquida que investiga la secreción de LK8 y el azúcar restante. Para seleccionar el huésped óptimo para la producción de la proteína LK8, se transfectaron *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501, BY4742, CEN.PKZ-1D y 2805 con el vector de expresión de LK8 pMCLK8 (6,9 kb). Las cepas de levadura resultantes se cultivaron para expresar episódicamente la proteína LK8.

La figura 4 es una fotografía de una electroforesis que muestra los resultados de la inmunotransferencia que mide la cantidad de proteína LK8 producida por cada cepa tras 30 y 40 horas de cultivo.

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra el mapa de escisión del vector recombinante M δ LK8 construido para insertar el casete de expresión de LK8 que contiene el promotor GAL1, la señal de secreción del factor- α representado por el identificador de secuencia n°: 2, el ADNc de LK8 representado por el identificador de secuencia n°: 1 y el terminador CYC1 en el cromosoma de la levadura.

La figura 6 es un grupo de fotografías que muestra el cribado primario de la cepa. De forma más precisa, se realizó una transferencia de colonias para seleccionar la cepa que poseía la mayor resistencia frente a G418 sulfato, entre las cepas de levadura transformadas que contenía el casete de expresión de LK8 en su cromosoma. Se observó el oscurecimiento de la película:

- A: Tratamiento con 5 g/L de G418 sulfato;
- B: Tratamiento con 10 g/L de G418 sulfato; y
- C: Tratamiento con 15 g/L de G418 sulfato.

La figura 7 es una fotografía que muestra el segundo cribado de la cepa. La cepa seleccionada del cribado primario se fijó sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando un kit de transferencia. A continuación, se observó el oscurecimiento de la película utilizando un kit de detección.

La figura 8 es un gráfico que muestra el crecimiento dependiente del tiempo (*), la acumulación de galactosa suministrada (▼) y la galactosa restante (■) durante el proceso de fermentación de la cepa de levadura transformada *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/M δ LK8#36.

La figura 9 es una fotografía de una SDS-PAGE (electroforesis en gel poliacrilamida-SDS) del sobrenadante del cultivo durante la fermentación de la cepa de levadura transformada *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/M δ LK8#36:

- Carril 1: Marcador de tamaño;
- Carril 2: 38 horas después del inicio del cultivo;
- Carril 3: 86 horas después del inicio del cultivo;
- Carril 4: 110 horas después del inicio del cultivo;
- Carril 5: 134 horas después del inicio del cultivo;

Carril 6: 158 horas después del inicio del cultivo;

Carril 7: 184 horas después del inicio del cultivo;

Carril 8: 211 horas después del inicio del cultivo;

Carril 9: proteína LK8 control (200 mg/l); y

5 Carril 10 proteína LK8 control (100 mg/l).

La figura 10 es una fotografía de una electroforesis. Para comparar los efectos de los dos métodos (expresión en plásmido del gen de LK8 y expresión tras la inserción en el cromosoma) sobre la expresión y secreción de la proteína LK8, se procedió al cultivo discontinuo de las cepas de levadura transformadas *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8 Y *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8#36. Se cuantificó la proteína LK8 secretada en función del tiempo mediante inmunotransferencia:

Carril 1: Estándar de LK8, 10 mg/L;

Carril 2: Estándar de LK8, 50 mg/L;

15 Carril 3: 20 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

Carril 4: 30 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

Carril 5: 40 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

20 Carril 6: 20 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

Carril 7: 30 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

25 Carril 8: 40 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8;

Carril 9: 20 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8#36;

Carril 10: 30 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8#36; y

30 Carril 11: 40 horas después del inicio del cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8#36.

La figura 11 es un cromatograma que muestra la etapa de purificación de la proteína LK8 mediante cromatografía de intercambio catiónico;

Lavado: 0,1 - 1M de solución de fosfato sódico;

35 Elución: 0,1 - 1M de fosfato sódico, 0 - 2M de solución de NaCl; y

Lavado: 0 - 2M de solución de NaCl.

La figura 12 es una fotografía de una SDS-PAGE que muestra la proteína LK8 en cada fracción eluida de cada fracción de la cromatografía de intercambio catiónico SP-Sefarosa:

Carril 1: Marcador de tamaño;

40 Carril 2: Sobrenadante de la solución de cultivo final;

Carril 3: muestra diluida 5 veces de sobrenadante de la solución de cultivo final;

Carril 4: Muestra diluida no unida a la resina;

Carril 5: Muestra utilizada para lavar la resina;

Carril 6: Fracción eluida #1;

Carril 7: Fracción eluida #2;
 Carril 8: Fracción eluida #3;
 Carril 9: Fracción eluida #4; y
 Carril 10: Muestra eluida sin NaOH.

5 La figura 13 es un cromatograma que muestra la purificación específica de la proteína LK8 mediante cromatografía de interacción hidrofóbica a la mitad de los procesos completos de secreción y purificación de la proteína LK8:

Lavado: 0,1 – 1M de solución de fosfato sódico;
 Elución: 0,1 – 3M de sulfato amónico, 0,1 – 1 M de fosfato sódico, solución de NaCl; y

10 Lavado: Solución de NaCl.

La figura 14 es una fotografía de una PAGE que muestra el contenido de proteína LK8 de cada fracción de la cromatografía de interacción hidrofóbica SP-fenilsefariosa 6FF (flujo rápido):

Carril 1: Marcador;
 Carril 2: Muestra eluida de la resina de intercambio catiónico SP-sefariosa;
 Carril 3: Muestra diluida no unida a la resina;
 Carril 4: Fracción eluida #1;
 Carril 5: Fracción eluida #2;
 Carril 6: Fracción eluida #3;
 Carril 7: Muestra eluida con fosfato sódico;
 Carril 8: Muestra eluida con agua destilada; y
 Carril 9: Marcador de tamaño.

Modo para llevar a cabo la invención

Las realizaciones prácticas y actualmente preferentes de la presente invención son ilustrativas, tal como se muestran en los ejemplos siguientes.

25 Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, al considerar la presente descripción, pueden realizar modificaciones y mejoras dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

<Ejemplo 1> Construcción del vector de expresión recombinante con el gen LK8

Se construyó en levaduras un vector para la expresión de un gen, que contenía el ADNc de LK8 compuesto por la secuencia de aminoácidos de la región kringle V38 de la apolipoproteína (a) humana.

30 En concreto, para separar conjuntamente la secreción de señal del factor- α y el ADNc de LK8, los presentes inventores utilizaron el vector de expresión pMBRI-LK8 (Publicación de patente coreana nº 2004-0069840) que se ha utilizado para la producción de proteína LK8 recombinante en *Pichia pastoris*. Como vector vacío para la construcción del vector de expresión pMBRI-LK8 se utilizó el vector pPIC9 (8,0 kb) adquirido de Invitrogen (Holanda). Exactamente, se utilizó el promotor AOX1 del vector de expresión
 35 pPIC9 para inducir la expresión del gen LK8 por metanol, y para jugar un papel en la secreción de la proteína LK8 fuera de la célula que se expresó mediante la unión de un gen ADNc de LK8 diana en la región por detrás de la señal de secreción del factor- α . Con este fin, se amplificó el gen LK8 mediante PCR utilizando como molde pET15b/LK8 (Publicación de patente internacional nº WO 01/19868). A continuación, se digirió el gen amplificado con los enzimas de restricción *Xho* I y *Eco*R I. Se llevó a cabo
 40 una subclonación para insertar el fragmento del gen dentro del vector pPIC9, dando lugar a la construcción de pMBRI-LK8 (8,25 kb).

El vector de expresión pMBRI-LK8 se trató con el enzima de restricción *Eco*R I durante 7 horas, seguido de lavado con un kit de purificación de PCR (Qiagen, EE.UU.). El vector se trató con el enzima de restricción *Bam*H I durante 7 horas. El ADN se separó mediante electroforesis y se obtuvieron el
 45 fragmento de ADN que contenía la señal de secreción del factor- α representada por el identificador de secuencia nº 2 y la secuencia de nucleótidos del ADNc de LK8 representada por el identificador de secuencia nº 1 utilizando el kit de extracción de gel (QIAGEN) (figura 1). El fragmento de ADN obtenido se

insertó entre el promotor GAL1 y el terminador CYC1 del vector p426GAL1 (ATCC 87833, EE.UU.) para construir el vector de expresión pMCLK8 (6,9 kb) para la producción de LK8 recombinante en levaduras (figura 2). Dado que el vector de expresión contiene el promotor GAL1, la expresión de la proteína es inducida por galactosa. Se utilizó el marcador URA3 para seleccionar las cepas de levadura transformadas en un medio de selección.

<Ejemplo 2> Selección de la cepa huésped para la expresión de la proteína LK8.

Para seleccionar una cepa huésped óptima para la expresión de la proteína LK8, se seleccionaron para el experimento, entre diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, BJ3501 (ATCC 208280, EE.UU.), BY4742 (EUROSCARF Y10000, Alemania), CEN.PK2-1D (EUROSCARF 30000B, Alemania) y 2805 (Sohn, J.H., J Microbiol. Biotechnol., 1:266-273, 1991).

En concreto, cada cepa mencionada en el párrafo anterior se transfectó con el vector de expresión construido en el anterior ejemplo 1 utilizando el kit para levaduras catión alcalino (Q-Biogene Canadá). Las cepas se cultivaron en medio de base nitrogenada para levaduras sin uracilo [(base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, Difco, EE.UU.) 0,67% y (suplemento de medio "drop-out" sintético para levaduras sin uracilo, Difco, EE.UU.) 0,192%], para confirmar si se producía o no la transformación. Para la producción de LK8 recombinante, se cultivó (30°C, pH 5,5, 700 rpm) cada cepa en un birreactor (Biostat, Q. B. Braun Biotech International, Alemania) con medio YPDG, (peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, galactosa 3%). Durante el proceso de fermentación, se recuperó el medio de cultivo cada 4 horas, y se recolectó el sobrenadante conteniendo proteína LK8 mediante centrifugación (15.000 rpm, 5 minutos). Se realizó una cromatografía líquida para investigar la concentración residual de azúcar en el sobrenadante del cultivo (figura 3), y se realizó una inmunotransferencia para cuantificar la proteína LK8 recombinante secretada (figura 4).

Como resultado, la proteína LK8 fue secretada por cada cepa transformada, indicando que el vector de expresión pMCLK8 se introdujo con éxito. En concreto, se demostró que *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501 era el huésped óptimo que mostraba la secreción más alta de proteína LK8 por célula.

<Ejemplo 3> Construcción de un casete de integración del gen LK8 y su inserción múltiple en el cromosoma de levadura.

Se construyó un vector recombinante para la inserción del casete de expresión de LK8 compuesto por el promotor GAL1, la señal de secreción del factor- α , la secuencia de nucleótidos del ADNc de LK8 y el terminador CYC1 dentro del cromosoma de la levadura. Y se obtuvo una cepa de levadura transformada transfectada con este vector.

En concreto, se utilizó como vector madre el vector p δ neo (Lee, FWF., Appl. Microbiol. Biotechnol., 48:339, 1997) que es capaz de insertar un gen diana dentro de una secuencia δ , uno de los elementos de transición del cromosoma de las levaduras. El vector p δ neo incluye una secuencia δ que permite la inserción múltiple de un vector mediante recombinación homóloga y un gen de resistencia a la neomicina (neo) que permite la selección del vector insertado. El casete de expresión de LK8 y el vector p δ neo poseen un sitio de reconocimiento del enzima de restricción *Sa*I. El lugar de reconocimiento del enzima de restricción *Sa*I es esencial para la inserción del vector dentro del cromosoma de las levaduras. Por lo tanto, se eliminó el lugar de reconocimiento del enzima de restricción *Sa*I del casete de expresión de LK8 utilizando el kit de embotamiento de ADN (Takara, Japón). Al mismo tiempo, el casete de expresión de LK8 se separó del vector pMCLK8 construido en el ejemplo 1 anterior con los enzimas de restricción *Sac*I y *Kpn*I que cortan los dos extremos del promotor GAL1 y del terminador CYC1. Dado que el vector p δ neo no posee el lugar de reconocimiento del enzima de restricción *Kpn*I, tanto el lugar de reconocimiento del enzima de restricción *Xba*I del vector p δ neo y el lugar de reconocimiento del enzima de restricción *Kpn*I del casete de expresión de LK8 separado se hicieron con extremos romos. A continuación, se construyó un vector recombinante insertando el casete de expresión de LK8 dentro del vector p δ neo recombinante construido previamente, que se denominó M δ LK8 (figura 5).

Ek M δ LK8 se convirtió en lineal mediante tratamiento con el enzima de restricción *Sa*I. A continuación, se transfectó una cepa de levadura con el M δ LK8 convertido en lineal utilizando un kit para levaduras catión alcalino (Q-Biogene, Canadá). Para insertar masivamente el casete de expresión de LK8 dentro del cromosoma de la levadura, se concentró el M δ LK8 convertido en lineal.

Se seleccionó la levadura transformada transfectada con el casete de integración recombinante M δ LK8 convertido en lineal de la presente invención utilizando una placa YPD (peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, agar 2%) con G418 sulfato. En este punto, se ajustaron las concentraciones de G418 sulfato a 5 g/L, 10 g/L y 15 g/L, respectivamente, para cultivar la cepa de levadura transformada.

Como resultado, cuando el casete de expresión de LK8 se insertó masivamente dentro del cromosoma de la levadura, la levadura pudo cultivarse incluso en un medio con alta concentración de G418 sulfato y la actividad LK8 también fue alta (figura 6). Por lo tanto, se obtuvieron decenas de miles de

colonias de levaduras transformadas que poseían resistencia frente G418 sulfato (incluso a concentraciones superiores a los 15 g/L), debido a la introducción masiva del gen de LK8 dentro del cromosoma de la levadura.

<Ejemplo 4> Selección primaria de un gran productor de la proteína LK8 mediante inmunotransferencia de colonias.

Entre las cepas de levadura transformadas seleccionadas en el ejemplo 3 anterior, se seleccionaron primariamente las cepas que secretaban más proteína LK8 mediante inmunotransferencia de colonias.

En concreto, se distribuyeron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre medio sólido YPD, seguido de cultivo a 30°C durante 24 horas. A continuación, se observó la formación de colonias. Se colocó una membrana de celulosa esterilizada sobre la colonia y a continuación se retiró de forma cuidadosa. Mientras tanto, se colocó una membrana de nitrocelulosa sobre medio sólido YPG, sobre la cual se colocó, de forma cuidadosa para no generar burbujas de aire, la membrana de celulosa previamente citada con las colonias unidas mirando hacia arriba. A continuación, se cultivó el medio sólido conteniendo las colonias a 30°C durante 48 horas. Se retiró de forma cuidadosa la membrana de celulosa y se colocó en un nuevo medio sólido YPD. La membrana de nitrocelulosa restante se retiró y se utilizó para la inmunotransferencia.

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución suplementada con solución tampón PBS que contenía un 0,1% (volumen/volumen) de Tween 20® y un 5% (peso/volumen) de leche descremada en polvo, que se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió en la misma solución anticuerpo LK8 de conejo, que también se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de lavado cinco veces con solución tampón PBS con un 0,1% de Tween 20®. Se introdujo IgG-HRP anti-conejo (Sigma EE.UU.) en una solución que contenía solución tampón PBS suplementada con Tween 20® al 0,1% y leche descremada en polvo al 5%, en la cual se sumergió la membrana nitrocelulosa previamente descrita, seguido de agitación suave a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó cinco veces con solución tampón PBS que contenía Tween 20® al 0,1%. A continuación, se extrajo la membrana de nitrocelulosa y se transfirió a una solución de detección (Pierce, EE.UU.) proporcionada por el kit de detección (SuperSignal™ West Pico kit, Pierce, EE.UU.) que se fijó en una película radiográfica. Se investigó el oscurecimiento de la película.

Como resultado, el oscurecimiento difirió según la cantidad de LK8 expresada (figura 6), y en concreto, se seleccionaron primariamente aquellas cepas que mostraban un oscurecimiento mayor.

<Ejemplo 5> Segundo cribado de los grandes productores de proteína LK8 mediante transferencia puntual.

Entre las cepas seleccionadas del cribado de colonias primario en el anterior ejemplo 4, se seleccionaron mediante transferencia puntual las cepas que secretaban más proteína LK8.

En concreto, se inocularon las cepas seleccionadas primariamente en el ejemplo 4 dentro de tubos de ensayo que contenían medio líquido YPG (peptona 2%, extracto de levadura 1%, galactosa 2%) seguido de cultivo en agitación a 30°C, 180 rpm durante 48 horas. 48 horas más tarde, se centrifugó la solución de cultivo a 5.000 rpm durante 5 minutos para obtener únicamente el sobrenadante. El sobrenadante se diluyó 10 veces con PBS, y se unió sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando el kit de transferencia puntual (Bio-Rad, EE.UU.). Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución de glutaraldehído al 0,5% (volumen/volumen) durante 5-10 minutos, y a continuación se transfirió a una solución de glicina 50 mM, seguido de lavado con solución tampón PBS. A continuación, se extrajo la membrana de nitrocelulosa y se transfirió a una solución de detección, que estaba fijada sobre una película radiográfica. Se investigó el oscurecimiento de la película mediante un kit de detección de forma similar al procedimiento descrito en el ejemplo 4 anterior.

Como resultado, el oscurecimiento difirió según la cantidad de LK8 expresada (figura 7). En concreto, se seleccionaron secundariamente las cepas que mostraban un oscurecimiento mayor.

<Ejemplo 6> Tercer cribado de grandes productores de proteína LK8 mediante ELISA.

Finalmente, entre las cepas seleccionadas en el segundo cribado del anterior ejemplo 5, se seleccionaron mediante ELISA (enzimoinmunoanálisis) las cepas que producía la proteína LK8 de forma masiva.

En concreto, se inocularon las cepas seleccionadas secundariamente en tubos de ensayo que contenían medio líquido YPD, seguido de cultivo en agitación a 30°C con 180 rpm durante 48 horas. Se inoculó la solución de cultivo en frascos que contenía medio líquido YPG. A continuación, se ajustó la OD (densidad óptica) mediante medio líquido YPG. Se llevó a cabo un cultivo en agitación a 30°C con 180

rpm durante 48 horas. Se realizó la centrifugación de la solución para obtener únicamente el sobrenadante.

Se colocaron anticuerpos anti-LK8 de conejo sobre un inmunomódulo (Maxisorp™ Immunomodule, Nunc, EE.UU.), seguida de recubrimiento con un tampón de recubrimiento (carbonato sódico 0,1M, pH 9,6) para ELISA. El inmunomódulo recubierto se trató con solución tampón PBS suplementado con BSA (albúmina sérica bovina) al 1% y Tween 20® al 0,1%, y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante se diluyó 1000 veces con solución tampón PBS suplementada con Tween 20® al 0,1%, y se colocó en el inmunomódulo para hacerlo reaccionar adicionalmente a 37°C durante 1 hora. A continuación, se lavó el inmunomódulo con solución tampón PBS suplementada con BSA al 1% y Tween 20® al 0,1%.

Por otro lado, se diluyeron anticuerpos anti-LK8 de rata con solución tampón PBS suplementada con BSA al 1% y Tween 20® al 0,1%. La solución se puso en inmunomódulo, seguido de reacción a 37°C durante 1 hora. Cuando finalizó la reacción, se lavó el inmunomódulo con solución tampón PBS suplementada con BSA AL 1% y Tween 20® al 0,1%.

Para los procesos de reacción anteriores, cada inmunomódulo se coloreó durante 15 minutos con reactivo de coloración TMB (TMB Peroxidase Substrates, KPL, EE.UU.), y a continuación se finalizó la reacción de coloración con solución fosfato 1M. Se determinó la OD₄₀₅ para cuantificar la expresión de la proteína LK8.

Tabla 1 Cuantificación de la expresión de LK8 mediante curva estándar

Cepa muestra	1	102	11	17	25	B9	B12	B31	B36
µg/mL	113	97	57	80	104	63	59	103	129

La expresión de LK8 se cuantificó mediante curva estándar (tabla 1). En conclusión, la cepa que mostraba la mejor expresión de LK8 fue B36, que se denominó "*Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MδLK8 #36". La cepa se depositó en la Colección Coreana de Cultivos Tipo del Instituto Coreano de Investigación en Ciencias Biológicas y Biotecnología (#52, Aeun-dong yousung-ku, Daejeon, Corea) el 13 de enero de 2004 (nº de orden: KCTC 10582BP).

Se realizó una hibridación de transferencia Southern para investigar el número de copias de ADNc recombinante LK8 de la cepa. Como resultado, se confirmó que se insertaron con éxito aproximadamente 8 copias del gen LK8.

<Ejemplo 7> Cultivo por siembra, cultivo discontinuo y cultivo semicontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MδLK8 #36

<7-1> Cultivo por siembra

En la presente invención se distribuyó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MδLK8 #36 transformada en cientos o miles de viales de almacenamiento esterilizados, los cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones, es decir estuvieron bajo el control de un "sistema de banco celular de trabajo" establecido por los presentes inventores para mantener la cepa adecuada como semilla para el cultivo por siembra para la producción de la proteína recombinante. La cepa transformada se cultivó, como semilla, en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) durante 24 horas para garantizar la masa de células deseada [y actividad (en el caso de dilución 20 veces, OD₆₀₀ = 0,8 – 1,2)].

<7-2> Cultivo discontinuo.

El cultivo por siembra se realizó en medio YPD. A continuación, se realizó el cultivo discontinuo en medio de partida inoculado con la solución del cultivo por siembra obtenida en el ejemplo anterior 7-1. En esta etapa, se inoculó la solución de cultivo por siembra a una proporción superior al 1%, y se utilizó glucosa y galactosa como fuente de carbono para incrementar el número de células y permitir que se adapten a la galactosa. El medio de partida estaba compuesto por entre un 1% y un 5% (peso/volumen) de glucosa, entre un 1% y un 5% (peso/volumen) de galactosa, entre 1 y 50 g/L de extracto de levadura, entre 1 y 10 g/L de ácido casamino, entre 0,1 y 5 g/L de uracilo y entre 0,1 y 5 g/L de histidina.

El suministro de aire se reguló entre 1 y 3 vvm y la velocidad de agitación se controló entre 200 y 1.000 rpm, según la composición del medio. Como resultado, el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 40% durante toda la etapa de cultivo discontinuo.

En esta etapa, la concentración de células alcanza un nivel superior a 30 de O.D. a 600 nm.

<7-3> Cultivo semicontinuo.

El cultivo semicontinuo es la etapa para incrementar la masa celular y el nivel de secreción de la proteína LK8 mediante la adición de galactosa, la cual es utilizada como inductor y única fuente de carbono.

En concreto, se utilizó para el cultivo semicontinuo un medio de alimentación con entre un 20% y un 50% (peso/volumen) de galactosa, entre 1 y 50 g/L de extracto de levadura, entre 1 y 30 g/L de peptona, entre 0,1 y 5 g/L de uracilo y entre 0,1 y 5 g/L de histidina. En este punto, para inducir el incremento de la secreción de la proteína LK8, se suplementó el medio de alimentación para mantener el contenido en galactosa en medio por debajo del 5% (peso/volumen).

Para mantener la concentración de galactosa constante durante el cultivo semicontinuo, se determinó su contenido en la solución de cultivo de forma periódica, controlándose a continuación la velocidad del suministro de galactosa durante todo el proceso de fermentación, provocando un incremento en la expresión y secreción de LK8 (figura 8). Del cultivo semicontinuo, la proteína LK8 se secretó en el rango de los centenares de miligramos por 1L de sobrenadante (figura 9).

<Ejemplo 8> Comparación entre la expresión episómica y la expresión cromosómica de LK8.

Para comparar la eficacia de la secreción de la proteína LK8 entre la expresión episómica y la expresión cromosómica, se cultivaron *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8 que mostró la mayor eficacia en la expresión de LK8 en el ejemplo 2 y *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8 #36 preparado en el ejemplo 6, mediante el método de cultivo discontinuo utilizado en el ejemplo 7-2, y a continuación se determinaron las secreciones máximas de LK8 de los mismos (figura 10). Como resultado, tal como se muestra en la figura 10, la secreción de LK8 inducida por la expresión cromosómica (*Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/MΔLK8 #36) tras 30 horas de cultivo discontinuo era dos veces superior a la inducida por la expresión episómica (*Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/pMCLK8).

<Ejemplo 9> Purificación de la proteína LK8 mediante cromatografía.

La proteína LK8 es una molécula hidrofílica que posee un peso molecular entre 9 y 10 kDa, caracterizada por una baja solubilidad a pH neutro o en solventes orgánicos. Durante los procesos de expresión de la proteína LK, se observaron en la solución de cultivo otros derivados con pesos moleculares superiores o inferiores. Dichos derivados eran aparentemente aminoácidos cortados del extremo C-terminal o N-terminal de la proteína LK8 o derivados químicos. Sobre la base de dichas características físico-químicas de la proteína LK8 y condiciones de cultivo, se estableció en esta invención un proceso de purificación utilizando la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica, para producir proteína LK8 de alta pureza. De forma más precisa, se regularon el pH y la concentración salina mediante cromatografía de intercambio iónico para eliminar impurezas, seguido de la elución de la proteína LK8. A continuación, se realizó una cromatografía de interacción hidrofóbica dejando que la proteína LK8 altamente hidrofílica se uniera a la resina fijada bajo condiciones de alta concentración salina. Las impurezas se eliminaron disminuyendo la concentración salina. La elución de la proteína LK8 se realizó bajo condiciones de concentración salina adecuada, a continuación se eliminaron las impurezas hidrofóbicas (proteínas hidrofóbicas, lípidos o contaminantes no proteínicos incluyendo endotoxinas) disminuyendo la concentración salina. El proceso de purificación de la presente invención se explica a continuación de forma más precisa etapa por etapa.

<9-1> Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Se centrifugó la solución de cultivo obtenida en el ejemplo 7 a 8.000 rpm para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se diluyó 4 veces con fosfato sódico (monobásico) entre 0,1 y 1M y se ajustó el pH por debajo de 4. Se filtró la solución con un filtro de membrana. Se empaquetó una columna con resina SP-sefarosa FF (flujo rápido), seguido de un equilibrado con solución de fosfato sódico (monobásico) entre 0,1 y 1M. A continuación, se cargó el sobrenadante diluido en la columna de SP-sefarosa, se pasó a través de la columna una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M como línea basal. Se lavó la columna con una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 7) para eliminar impurezas. A continuación, se realizó la elución de la proteína LK8 mediante rebosamiento con una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M que contenía NaCl entre 0 y 2M (pH 5 – 9).

Como se confirmó mediante cromatograma (figura 11) y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (figura 12), la mayoría de las impurezas se eliminaron mediante el lavado con la solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M, y solamente se eluyó proteína LK8 de las fracciones utilizando la solución de fosfato sódico que contenía NaCl entre 0 y 2 M.

<9-2> Purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.

Se empaquetó una columna con resina SP-sefarosa 6FF (flujo rápido), seguido de equilibrado con una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 9) que contenía sulfato amónico entre 0,1 y 3M

y NaCl entre 0 y 2 M. La muestra eluida del ejemplo 9-1 se disolvió con sulfato amónico (concentración final: 0,1 – 3M). A continuación, la solución se cargó en la columna de SP-sefarosa. Se pasó a través de la columna una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 9) que contenía sulfato amónico entre 0,1 y 3 M y NaCl entre 0 y 2 M como línea de base. Se lavó la columna con una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 9) que contenía sulfato amónico entre 0,1 y 3M y NaCl entre 0 y 2M. A continuación se realizó la elución de la proteína LK8 mediante rebosamiento con una solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 9) que contenía sulfato amónico entre 0,1 y 2M y NaCl entre 0 y 2M. Se realizó la diálisis de la proteína LK8 eluida con un filtro de membrana (10.000 D, Sigma, EE.UU.) utilizando una solución de fosfato sódico 0,1M.

Tal como se confirmó mediante cromatograma (figura 13) y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (figura 14), la mayoría de las impurezas se eliminaron mediante el lavado con la solución de fosfato sódico entre 0,1 y 1M (pH 5 – 9) que contenía NaCl entre 0 y 2M y solamente se eluyó proteína LK8 de las fracciones utilizando la solución de sulfato amónico y NaCl.

Tabla 2

	LK8	Tasa de recuperación (%)
Carga	204,3	100
SP-sefarosa FF	160,6	80,1
SP-fenilsefarosa 6FF	134,9	66

Tal como se ha explicado previamente, la tasa de recuperación de la purificación de la proteína LK8 de la solución de cultivo preparada en el ejemplo 7 mediante cromatografía de intercambio catiónico fue del 80,1% y la tasa de recuperación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica fue del 66% (tabla 2).

Aplicabilidad industrial

Tal como se ha explicado previamente, se preparó una cepa transformada mediante la inserción de un casete de integración cromosómica para la expresión del gen de LK8 en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. El gen de LK8 pudo expresarse y secretarse de forma eficiente en un fermentador a gran escala proporcionando condiciones óptimas para el cultivo discontinuo y semicontinuo de la cepa mencionada. Utilizando los efectivos procesos de purificación de la presente invención, puede conseguirse la producción en masa de la proteína LK8. Por lo tanto, la cepa transformada y los procesos de producción de la proteína LK8 de la presente invención se espera que contribuyan a la comercialización de la proteína LK8 como un inhibidor de la angiogénesis novedoso.

Listado de secuencias

El identificador de secuencia nº: 1 es una secuencia de ADNc que codifica la proteína LK8.

El identificador de secuencia nº: 2 es una secuencia de ADN que codifica la señal de secreción del factor- α de *S. cerevisiae*.

<110> NOGAM BIOTECYHNCLOGY RESEARCH INSTITUTE

<120> *Saccharomyces cerevisiae* transformada y método para la producción en masa de la proteína LK8 utilizando el mismo

<130> 4fpo-11-16

<150> KR10-2004-0005033

<151> 2004-01-27

<160> 2

<170> KopatentIn 1. 71

<210> 1

<211> 258

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gen

<222> (1)..(258)

5 <223> LK8 ADNc

<400> 1

gaacaggact gcatgtttgg gaatgggaaa ggataccggg gcaagaaggc aaccactgtt	60
actgggacgc catgccagga atgggctgcc caggagcccc atagacacag cactgtcat	120
ccagggacaa ataaatgggc aggtctggaa aaaaattact gccgtaaccc t gat ggt gac	180
at caat ggt c cct ggt gct a cacaat gaat ccaagaaaac tttttgact a ct gt gat at c	240
cct ct ct gt g cat cct ct	258

<210> 2

<211> 255

10 <212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> sig_péptido

<222> (1)..(255)

15 <223> factor-alfa o señal de secreción

<400> 2

atgagatttc ctccaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct	60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt	120
tactcagatt tagaagggga ttfcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat	180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcatlg ctgctaaaga agaaggggt a	240
tctctcgaga aaaga	255

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada, que es *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501/M8LK8#36 depositada con el nº de orden: KCTC10582BP.

2. Método para la producción en masa de la proteína LK8 que comprende las etapas de:

5 (1) Cultivar por siembra la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada según la reivindicación y proceder al cultivo discontinuo de la cepa en un medio líquido que contiene glucosa y galactosa como fuentes de carbono, manteniendo el oxígeno disuelto estable mediante la regulación del suministro de aire y/o la velocidad de agitación;

10 (2) Proceder al cultivo semicontinuo de la solución de cultivo de la etapa 1 con un medio de alimentación que contiene galactosa; y

(3) Purificar la proteína LK8 de la solución de cultivo de la etapa 2.

15 3. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho cultivo discontinuo de la etapa 1 se realiza con un suministro de aire entre 1 y 3 vvm (5 – 80 L/minuto) y/o una velocidad de agitación entre 200 y 1.000 rpm, en un medio líquido que contiene entre un 1% y un 5% (peso/volumen) de glucosa y entre un 1% y un 5% (peso/volumen) de galactosa como fuente de carbono, en el cual se ajusta el oxígeno disuelto a entre un 40% y un 90% del oxígeno disuelto máximo.

20 4. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho cultivo semicontinuo de la etapa 2 se realiza utilizando un medio líquido que contiene entre un 10% y un 50% (peso/volumen) de galactosa como fuente de carbono y regulando la velocidad de suministro del medio de alimentación para mantener el contenido de galactosa en el medio entre un 0,5% y un 5% (peso/volumen).

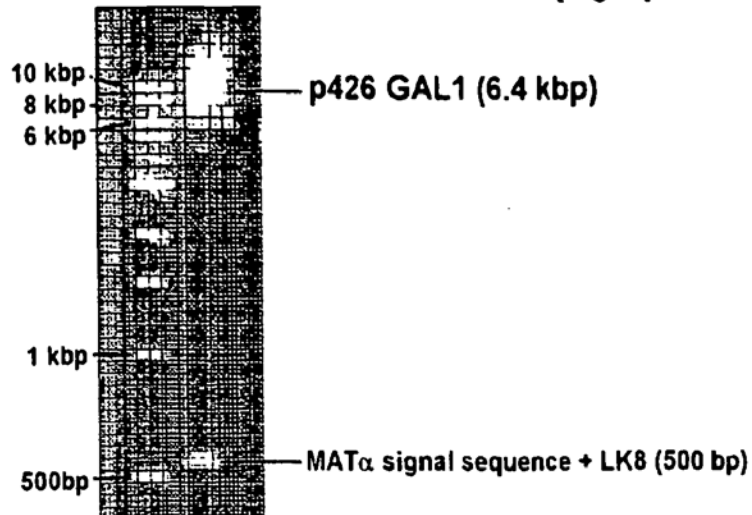
5. Método, según la reivindicación 2, en el que dicha purificación de la proteína LK8 de la etapa 3 se realiza mediante cromatografía.

6. Método, según la reivindicación 5, en el que dicha cromatografía incluye una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de interacción hidrofóbica.

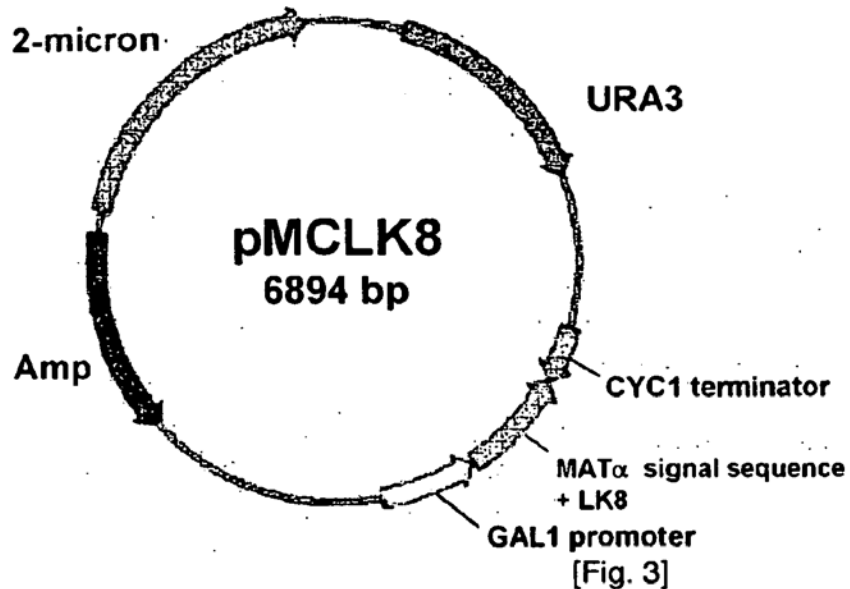
25 7. Método, según la reivindicación 6, en el que dicha cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio catiónico y la elución de la proteína LK8 se realiza con un tampón de elución (pH 4,0 – 8,0) que contiene NaCl entre 0 y 5M.

30 8. Método, según la reivindicación 6, en el que dicha cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de elución de fosfato sódico entre 0 y 100 mM (pH 4 – 8) que contiene sulfato amónico entre 0,1 y 5M y NaCl entre 0 y 500mM para la elución de la proteína LK8.

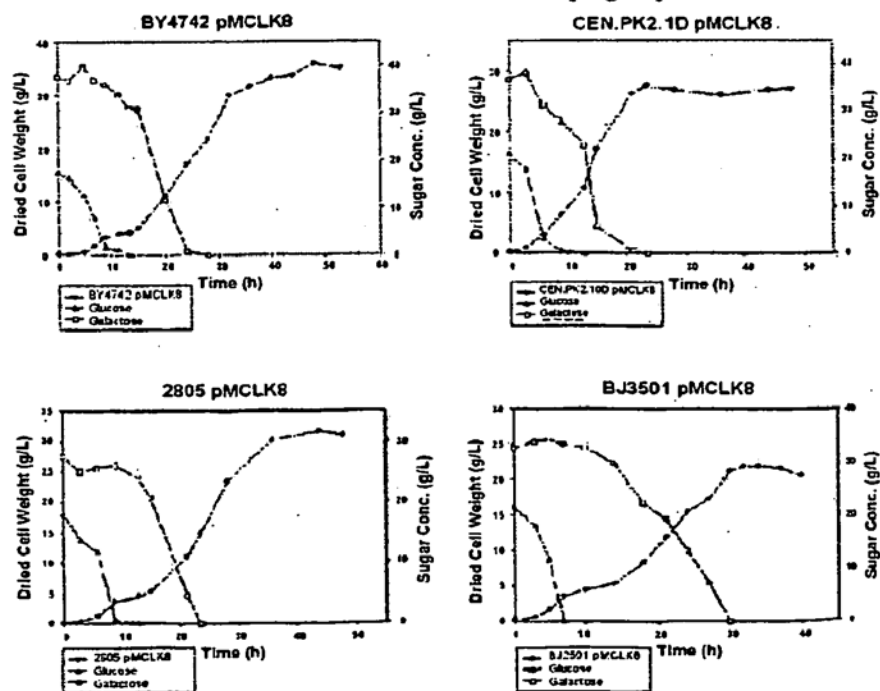
[Fig. 1]



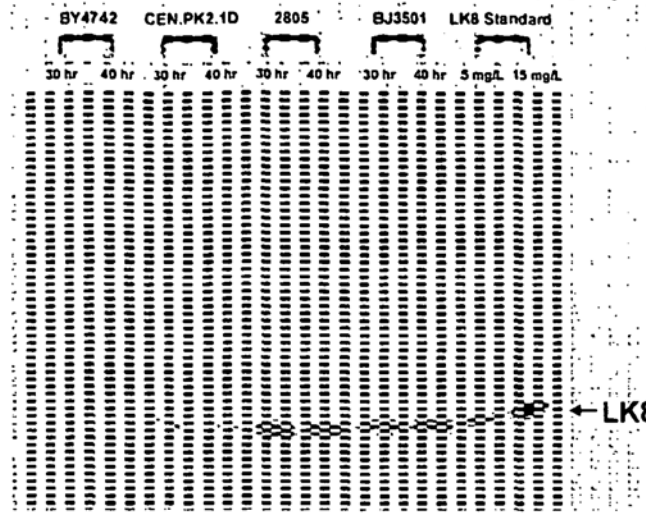
[Fig. 2]



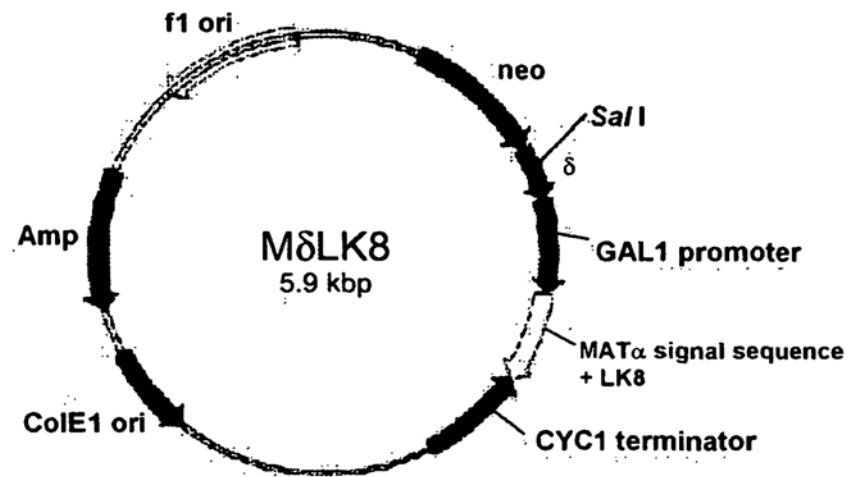
[Fig. 3]



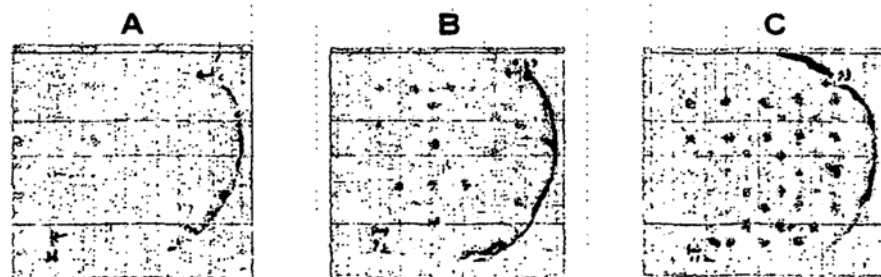
[Fig. 4]



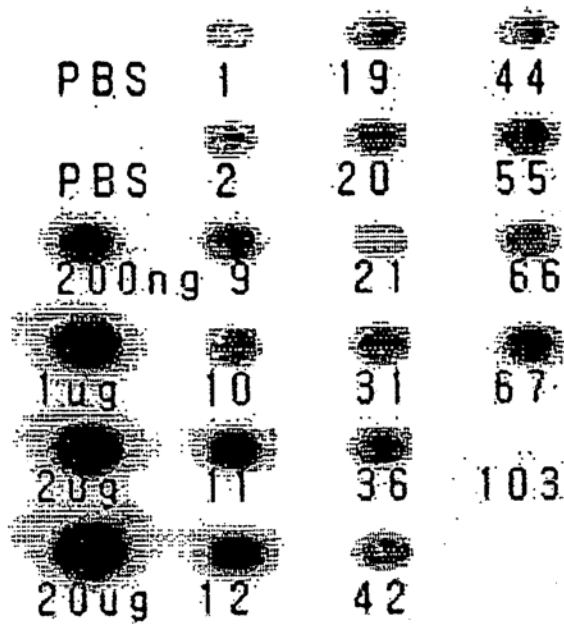
[Fig. 5]



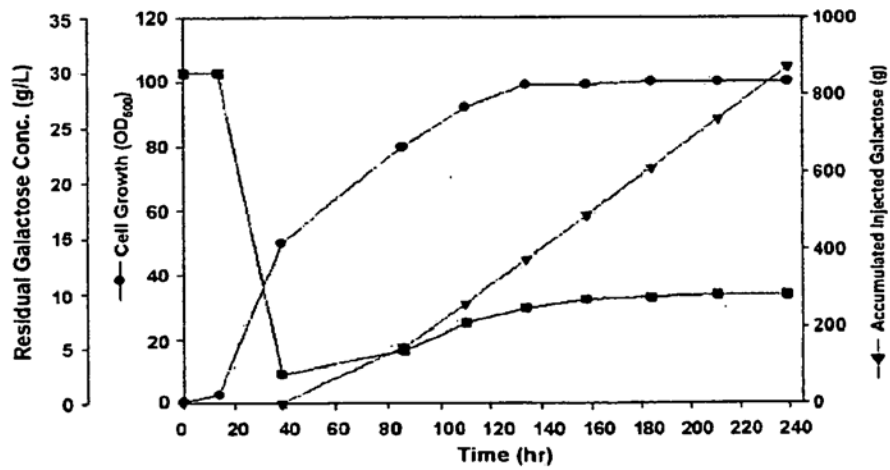
[Fig. 6]



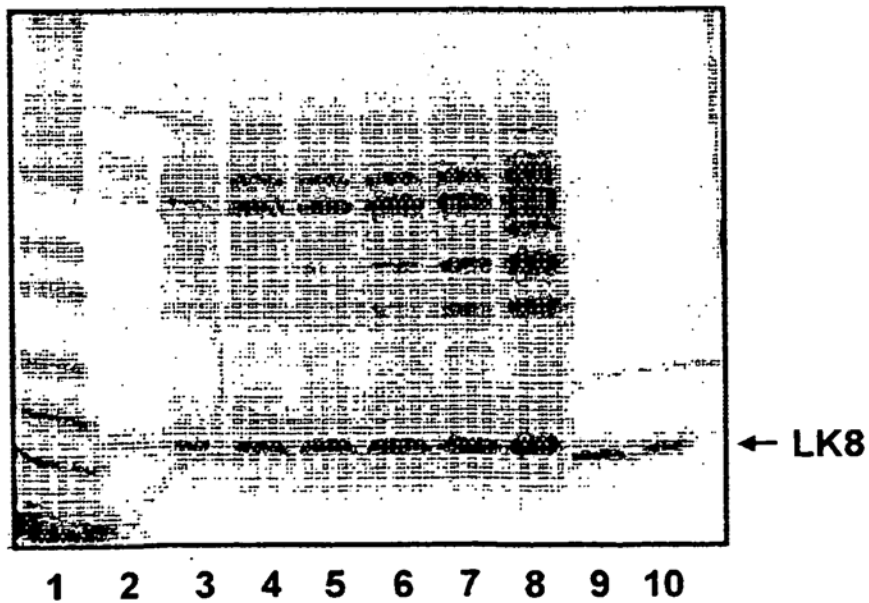
[Fig. 7]



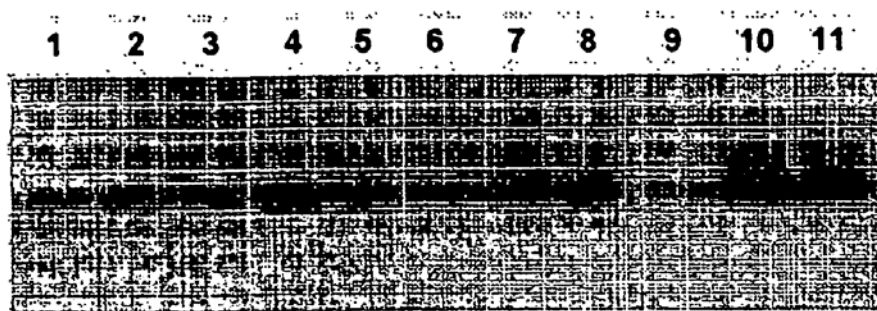
[Fig. 8]



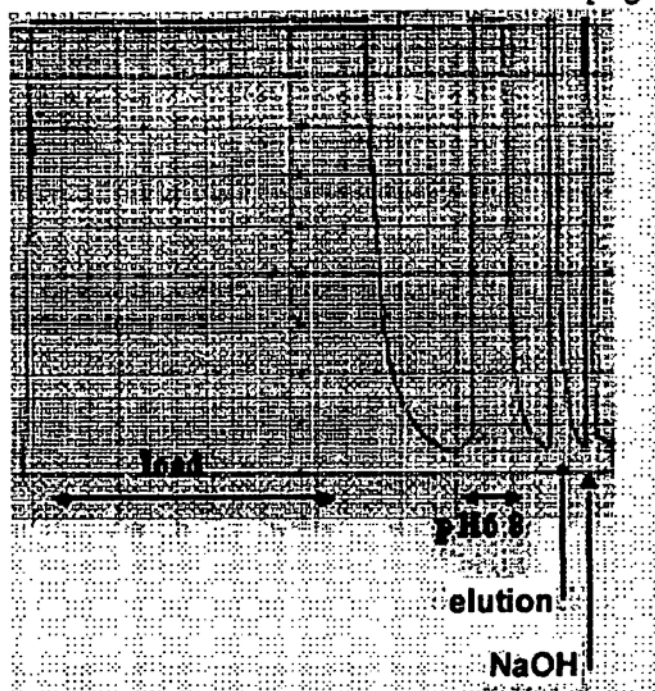
[Fig. 9]



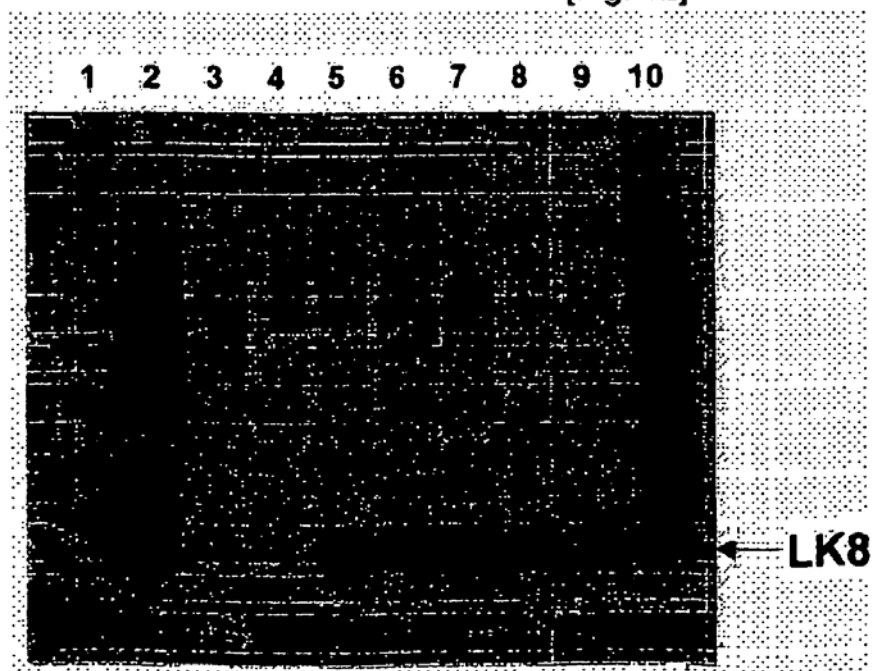
[Fig. 10]



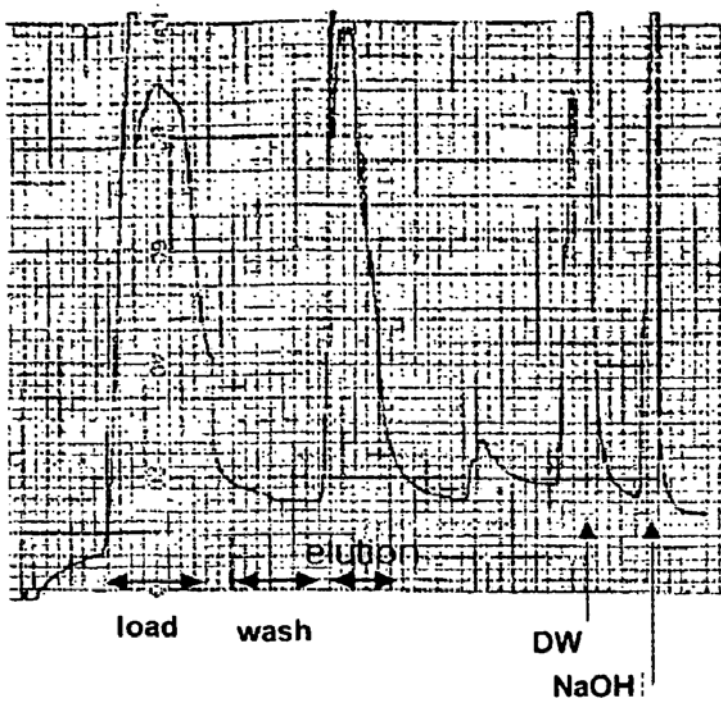
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

