

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 219**

51 Int. Cl.:
C07K 14/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05853969 .3**
96 Fecha de presentación: **12.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1828239**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **PRODUCCIÓN DE FGF18 EN HUÉSPEDES PROCARIOTAS.**

30 Prioridad:
10.12.2004 US 635023 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
**ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US**

72 Inventor/es:
**REARDON, Brian J.;
JULIEN, Susan D.;
CHAN, Chung-leung y
LIU, Hong, Y.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 219 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

Producción de FGF18 en huéspedes procariotas

Antecedentes de la invención

5 La identificación y disponibilidad aumentada de genes de seres humanos y otros genomas ha conducido a un aumento de la necesidad de expresión y purificación eficaz de proteínas recombinantes. La expresión de proteínas en bacterias es de lejos el enfoque más ampliamente usado para la producción de genes clonados. Por muchas razones, la expresión en bacterias se prefiere a la expresión en células eucariotas. Por ejemplo, las bacterias son mucho más fáciles de cultivar que las células eucariotas. Más específicamente, la disponibilidad de una gran cantidad de herramientas genéticas moleculares sofisticadas y miles de mutantes hacen a *E. coli*, como un huésped de expresión, extremadamente útil para producción de proteínas. Sin embargo, la producción de alto nivel de proteínas funcionales en *E. coli*, especialmente las de fuentes eucariotas ha sido con frecuencia difícil.

10 FGF18 es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos que comparte homología de secuencia significativa con FGF8 y FGF17. Se cree que estos tres factores comprenden una subfamilia de las proteínas FGF. Como con todos los miembros de la familia de la FGF, FGF18 tiene efectos discretos en tejidos tanto en desarrollo como adultos y se cree que desempeña un papel en el desarrollo embrionario y la curación de heridas (véase, por ejemplo, Ornitz y Marie, *Genes & Development*, 16: 1446-1465 (que analiza el papel de todas las FGF, incluyendo FGF18 en el desarrollo de hueso)). En particular, se ha mostrado que FGF18 tiene efectos proliferativos en cartílago y tejidos neurales, entre otros (Ellsworth y col, *Osteoarthritis and Cartilage* (2002) 10, 308-320; Ellsworth y col. *Stroke* (2003) 34(6): 1507-12).

15 Se ha producido FGF18 en células procariotas, en particular *E. coli*. La proteína producida en bacterias resultante no está glucosilada y se produce en un estado agregado. Los experimentos iniciales indicaron que FGF18 producida en bacterias dio como resultado truncación de la proteína, produciendo FGF18 truncada (trFGF18). Como la versión truncada parecía tener propiedades biológicas muy similares, si no idénticas, a la proteína de longitud completa, se realizaron después construcciones que producían solamente la versión truncada. La producción de FGF18 o trFGF18 de *E. coli* requiere que las proteínas agregadas se solubilizan a partir de los cuerpos de inclusión insolubles y se renaturalicen o replieguen. Sin la renaturalización, la actividad específica de la proteína recombinante se reducirá significativamente.

20 A pesar de los avances en la expresión de proteínas recombinantes en huéspedes bacterianos, existe una necesidad de procedimientos mejorados para producir proteínas FGF18 y trFGF18 biológicamente activas y recombinantes purificadas en sistemas procariotas que dan como resultado mayores rendimientos para producción proteica. Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Además, se identifican posteriormente diversas referencias.

25 Ellsworth J L y col., *Osteoarthritis and Cartilage*. Abril 2002. Vol. 10 (4), páginas 308-320, indica que FGF-18 es un factor trófico para condrocitos maduros y sus progenitores.

30 Hu M C y col, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 18(10), Octubre de 1998, páginas 6063-6074, indica que FGF-18 es un miembro de la familia FGF y estimula proliferación hepática e intestinal.

35 Ellsworth J L y col, *Stroke*. Junio de 2003, Vol. 34(6), páginas 1507-1512, indica que FGF-18 redujo los volúmenes de infarto y los déficits de comportamiento después de oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas.

El documento WO 01/39788 describe procedimientos para dirigirse a células que expresan FGFR3 o FGFR2.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión como se define en las reivindicaciones para producir proteínas FGF18 o trFGF18 que comprenden los elementos unidos de forma operativa de un origen de replicación procariota, un elemento de ADN de inicio de la transcripción y secuencia polinucleotídica y un terminador de la transcripción. En otro aspecto, el vector de expresión es el vector pSDH170 (SEC ID N°:1) que puede usarse para producir FGF18. En otro aspecto, el vector de expresión es pSDH174 (SEC ID N°: 2) que puede usarse para producir trFGF18. Realizaciones adicionales que proporcionan el vector de expresión pueden incluir un marcador seleccionable.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped procariotas como se define en las reivindicaciones transformadas con los vectores de expresión que se ha descrito que comprenden SEC ID N°: 3:, una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 4. o un vector pSDH170 (SEC ID N°: 1). En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped procariotas como se define en las reivindicaciones transformadas con los vectores de expresión que se ha descrito que comprenden SEC ID N°: 5, una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 6 o vector pSDH174 (SEC ID N°: 2). En otra realización, la cepa huésped es la cepa de *E. coli* W3110 o la cepa zGOLD1 o zGOLD5.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos como se define en las reivindicaciones para producir proteínas FGF18 o trGF18 en condiciones en las que se expresa la proteína FGF18 o trFGF18. En una

realización, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que expresa FGF18 después de transformarse con pSDH170. En una segunda realización, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que expresa trfgh18 después de transformarse con pSDH174. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende SEC ID N°: 1. En realizaciones adicionales, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende SEC ID N°: 2. El procedimiento también comprende recuperar las células huésped del medio de crecimiento y después aislar la proteína FGF18 o trFGF18 de las células huésped.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para producir FGF18 o trFGF18 que comprende las etapas que se han descrito anteriormente, en un procedimiento de fermentación semicontinuo o un procedimiento de fermentación discontinuo como se ha definido en las reivindicaciones. En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos como se definen en las reivindicaciones para producir una proteína FGF18 o trFGF18 que comprende cultivar una célula huésped como se ha descrito anteriormente en un matraz de agitación a una DO₆₀₀ de 5 a 20 en un medio de crecimiento, inocular un frasco de fermentación con de 1 a 12 % de volumen a volumen (v/v) de medio de matraz de agitación que contiene células huésped, cultivar la célula huésped en un medio de crecimiento a un pH de 6,2 a 7,2, suministrándose una solución de alimentación al frasco de fermentación antes de que transcurrieran 15 horas de tiempo de fermentación (EFT), añadir un agente inductor al frasco de fermentación a 20 a 30 horas de EFT y recoger las células huésped a 48 a 56 horas de EFT. En una realización, el agente inductor es isopropil β-D tiogalactopiranosido (IPTG) a de 0,5 a 2 mM. En otra realización, la solución de alimentación comprende un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en glicerol y glucosa y la alimentación es de 5 a 15 gramos de carbohidrato por hora. En otra realización, el glicerol en la solución de suministro es de 40 a 70 % v/v de glicerol o la glucosa es de 40 a 70 % p/v de glucosa. En realizaciones adicionales, el glicerol es de aproximadamente 70 % v/v o la glucosa es de aproximadamente 60 % p/v.

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos como se define en las reivindicaciones para producir FGF18 o trFGF18 que comprenden sembrar en un matraz un inóculo que comprende células huésped *E. coli* W3110 que expresan un polipéptido de FGF18 o trFGF18 como se muestra en SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6 o una célula huésped *E. coli* W3110 que comprende vector pSDH170 o pSDH174, en los que se expresa un polipéptido FGF18 o trFGF18 y comprendiendo el medio crecimiento aproximadamente 5 g/l de glicerol, cultivar el inóculo en un medio de crecimiento durante 16 a 20 horas a aproximadamente 30 °C, transferir el inóculo en medio de crecimiento a un fermentador discontinuo a una concentración de inóculo de 0,5 a 5 % v/v, fermentar la fermentación discontinua a aproximadamente 37 °C y aproximadamente pH 6,8 con glicerol aproximadamente 2 %, introducir un suministro de glucosa a aproximadamente 8 horas EFT de aproximadamente 9,5 g de glucosa/litro/hora y continuar hasta el final de un ciclo de fermentación, añadir IPTG a aproximadamente 24 horas EFT a concentración final de 0,5 a 2 mM, fermentar aproximadamente 28 horas de IPTG recogiendo caldo de fermentación del fermentador, añadir un volumen igual de agua al caldo de fermentación y homogeneizar y centrifugar para recoger un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de FGF18 o trFGF18.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos como se define en las reivindicaciones para aislar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble que comprenden una secuencia de restos aminoácidos como se muestra en SEC ID N°:4 o SEC ID N°: 6 que comprende separar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble en agua de un sedimento o suspensión celular, disolver el material de FGF18 o trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico, diluir el disolvente caotrópico y replegar la proteína FGF18 o trFGF18; y aislar la proteína FGF18 o trFGF18, siendo capaz la proteína aislada de ser biológicamente activa. En una realización de la invención, la proteína FGF18 o trFGF18 aislada es al menos 90 % pura. En otra realización, la proteína FGF18 o trFGF18 aislada es al menos 90 % pura y tiene un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por mg de proteína FGF18 o trFGF18.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos como se define en las reivindicaciones para aislar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble que componen una secuencia de restos aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6 que comprende separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de FGF18 o trFGF18 insoluble en agua, homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión, disolver el material proteico de FGF18 o trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina, diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento, aislar la proteína FGF18 o trFGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración y purificar la proteína replegada FGF18 o trFGF18 en una columna de intercambio catiónico, en los que la proteína FGF18 o trFGF18 purificada y aislada es capaz de ser biológicamente activa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento como se define en las reivindicaciones para aislar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble que comprende una secuencia de restos aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6 que comprende separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material de FGF18 o trFGF18 insoluble en agua, homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión, disolver el material proteico de FGF18 o trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina, diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento, aislar la proteína FGF18 o trFGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración, purificar la proteína replegada FGF18 o trFGF18 en una columna de intercambio catiónico y purificar el eluato de FGF18 o trFGF18 en una columna de interacción hidrófoba, en el que la proteína FGF18 o trFGF18 purificada y aislada es capaz de ser biológicamente activa.

En otras realizaciones los procedimientos anteriores para aislar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble comprenden medir actividad biológica usando un ensayo de unión al receptor de FGF18.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 es una ilustración del plásmido de expresión pSDM170, que comprende la secuencia de nucleótidos con codones optimizados para FGF18.
La Figura 2 es una ilustración del plásmido de expresión pSDH174, que comprende la secuencia de nucleótidos de codones optimizados para trFGF18.

Descripción de la invención

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de la invención.

- 10 Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen
15 natural (por ejemplo, formas α -enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcares y/o en restos de base pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido o pueden funcionalizarse azúcares como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede reemplazarse con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcar carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden enlazarse por enlaces fosfodiéster o análogos de tales engarces. Los análogos de engarces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanotioato, fosforoanilidato, fosforamidato y similares. La expresión “molécula de ácido nucleico” también
20 incluye los denominados “ácidos péptido nucleicos”, que comprenden bases de ácido nucleico modificadas o de origen natural unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

- La expresión “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de
30 nucleótidos de referencia.

Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficacia de transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de comienzo de la transcripción.

- 35 “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de la célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que ese ADN huésped se combine con un ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, se considera que una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido de forma operativa a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de transcripción es una molécula de ADN heteróloga. Por
40 el contrario, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otra ilustración, se considera que una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo silvestre es ADN heterólogo si la molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen de tipo silvestre.

- El término “contig” indica una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas “solapan” en un tramo
45 dado de una molécula de ácido nucleico en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico.

- “ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenaria que se forma a partir de un molde de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se emplea un cebador complementario para partes de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la materia también usan el término “ADNc” para referirse a una
50 molécula de ADN bicatenaria que consiste en dicha molécula de ADN monocatenaria y su hebra de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.

- Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido
55 nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma

de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es menor que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

“ADN lineal” indica moléculas de ADN no circulares con extremos 5' y 3' libres. Puede prepararse ADN lineal a partir de moléculas de ADN circular cerradas, tales como plásmidos, por digestión enzimática o rotura física.

5 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor está localizado en la región no codificante 5' de un gen, proximal al sitio de comienzo de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que actúan en el inicio de la transcripción se caracterizan con frecuencia por secuencias de nucleótidos consenso. Estos promotores incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, promotores inducibles por IPTG, promotores del bacteriófago T7 y bacteriófago λ_{PL} . Véase
10 Sambrook y col, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Un promotor típico tendrá tres componentes, que consisten en las secuencias consenso a -35 y -10 con una secuencia de entre 16 y 19 nucleótidos entre ellas (Lisset, S. y Margalit, H., Nucleic Acids Res. 21: 1512, 1993). Los promotores de este tipo incluyen los promotores *lac*, *trp*, *trp-lac (tac)* y *trp-lac(trc)*. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la
15 tasa de transcripción no se regula por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores reprimibles.

Un “promotor central” contiene secuencias nucleotídicas esenciales para la función promotora, incluyendo el comienzo de transcripción. Por esta definición, un promotor central puede o no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica tisular.

20 Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador eucariota puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares que permiten la transcripción exclusivamente o preferencialmente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores se asocian normalmente con genes que se expresan de una manera “específica de célula”, “específica de tejido” o “específica de orgánulo”. Los promotores bacterianos tienen
25 elementos reguladores que se unen y modulan la actividad del promotor central, tales como secuencias operadoras que se unen a moléculas activadoras o represoras.

Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la
30 inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinada sin pérdida de una función biológica esencial en el vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a antibióticos.

Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Típicamente, un vector de expresión comprende un promotor transcripcional, un gen, un origen de replicación, un marcador seleccionable y un terminador de transcripción. La expresión génica habitualmente se sitúa bajo control de un promotor y se dice que dicho gen está “unido operativamente” al promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central están unidos operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central. Un vector de expresión también puede conocerse como una construcción de expresión.

40 Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga, tal como un vector de clonación o vector de expresión.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, expresión implica transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción de ARNm en uno o más polipéptidos.

45 La expresión “secuencia de señal secretora” indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor a través de una ruta secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor se escinde habitualmente para retirar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

Un “polipéptido” es un polímero de restos aminoacídicos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o de forma sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos aminoacídicos se denominan habitualmente “péptidos”.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidrato. Pueden añadirse carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a una proteína. Las proteínas se definen en el presente documento en referencia a sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos de carbohidrato y grupos no peptídicos generalmente no se especifican, pero pueden no obstante estar presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que está esencialmente sin componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente 80 % pura, al menos aproximadamente 90 % pura, al menos aproximadamente 95 % pura, más de 95 % pura o más de 99 % pura. Un modo de mostrar que una preparación proteica particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una banda sencilla después de electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación proteica y tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas glucosiladas o derivatizadas de forma alternativa.

Las expresiones “amino terminal” o “N-terminal” y “carboxilo terminal” o “C-terminal” se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estas expresiones se usan en referencia a una secuencia particular o parte de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia posicionada carboxilo terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza próxima al extremo carboxilo terminal de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo terminal del polipéptido completo.

Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes.

La expresión “marcador de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para la que está disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico puede usarse como un marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tramo de polihistidina, proteína A (Nilsson y col, EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson y col, Methods Enzymol, 198: 9 (1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988), marcador de afinidad Glu-Glu (Gruasemayer y col, Proc Natl. Acad. Sci. USA. 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col, Biotechnology, 6:1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general Ford y col, Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Las moléculas de ADN que codifican marcadores de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

El término “isotónico” se usa en el presente documento para su significado convencional, es decir, una tonicidad igual a la de la sangre, equivalente a una solución de NaCl de 0,9 %. “Una cantidad isotónica” de una sal es la cantidad requerida para componer una solución isotónica o producir una solución isotónica tras la reconstitución de una preparación liofilizada.

Las concentraciones se especifican en el presente documento en unidades de molaridad o % p/v de composiciones líquidas. Cuando la composición es en forma de un polvo liofilizado, las concentraciones de los componentes respectivos serán tales que proporcionen la concentración especificada tras la reconstitución del polvo.

Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos convencionales, se entiende que los pesos moleculares y longitudes de polímeros son valores aproximados expresados como “aproximadamente” X o “alrededor de” X, se entenderá que el valor indicado de X será preciso a $\pm 10\%$.

Expresión de FGF18 o TRFGF18 recombinante

La presente invención proporciona vectores de expresión y procedimientos como se define en las reivindicaciones para producir proteína FGF18 o trFGF18 recombinante a partir de un huésped procarionta. FGF18 se designó previamente zfgf5 y se describe completamente en las Patentes de Estados Unidos de cesión común 5.989.866, 6.518.236 y 6.352.971. En particular, los vectores de expresión y procedimientos de la presente invención comprenden un sistema de expresión de *E. coli* para la producción a gran escala de FGF18 o trFGF18 utilizando la secuencia de codificación de FGF18 o trFGF18 con cambios específicos en nucleótidos para optimizar codones y estructura secundaria de ARNm para traducción en *E. coli*. Usando los vectores de expresión y procedimientos de la presente invención, el gen de FGF18 o trFGF18 se produjo en *E. coli* a un nivel de más de 1 g/l en fermentación semicontinua. Los presentes inventores descubrieron que el uso de cepas deficientes en proteasa de *E. coli* OmpT como, por ejemplo, UT5600, como un huésped de producción superó los problemas de estabilidad con FGF18 o trFGF18. Además de FGF18 de longitud completa, puede producirse un polipéptido diferente, FGF18 truncado. (trFGF18) que es la secuencia codificante de FGF18 con un codón que codifica una Met N-terminal añadido en el extremo 5' de la secuencia polinucleotídica en el aminoácido 27 (Glu) y truncada en el aminoácido 196 (Lys). La secuencia trFGF18 es SEC ID N°: 5. Usando los vectores de expresión descritos en el presente documento mejoró significativamente el rendimiento de la proteína recombinante recuperada de las bacterias. En otra realización, para facilitar el desarrollo de fermentación semicontinua de alta densidad celular, se seleccionó otra cepa de *E. coli*, W3110, como un huésped para la producción a gran escala de FGF18 o trFGF18. Esta cepa huésped es no patogénica y puede crecer a alta densidad celular en medios de fermentación mínimamente definidos. La

productividad de FGF18 o trFGF18 en la cepa de *E. coli* W3110 fue comparable a la obtenida en la cepa de *E. coli* UT5600 cuando se produjo en matraz de agitación y fermentaciones discontinuas.

La presente invención también proporciona procedimientos como se definen en las reivindicaciones para recuperar proteína FGF18 o trFGF18 recombinante a partir de un huésped procarionta cuando la proteína se expresa por el huésped y se encuentra dentro de la célula huésped como un cuerpo de inclusión insoluble no glucosilado. Cuando la célula procarionta se lisa para aislar los cuerpos de inclusión (también denominados cuerpos refráctiles), los cuerpos de inclusión son agregados de FGF18 o trFGF18. Por lo tanto, los cuerpos de inclusión deben disociarse y disolverse para aislar la proteína FGF18 o trFGF18 y generalmente esto requiere el uso de un disolvente caotrópico desnaturalizante, dando como resultado la recuperación de un polipéptido que debe replegarse para tener actividad biológica significativa. Una vez que se repliega la proteína FGF18 o trFGF18, la proteína debe capturarse y purificarse. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para aislar proteína FGF18 o trFGF18 insoluble a partir de células procariontas, disolver el material proteico insoluble en un disolvente caotrópico, diluir el disolvente caotrópico de tal manera que la proteína FGF18 o trFGF18 se repliegue y aísle. La presente invención también incluye procedimientos para capturar la FGF18 o trFGF18 renaturalizada a partir del tampón de replegamiento diluido usando cromatografía de intercambio catiónico y purificar la proteína FGF18 o rFGF18 replegada usando cromatografía de interacción hidrófoba. Puede conseguirse purificación adicional usando intercambio aniónico en ensayos de unión usando un receptor de FGF18 y similares.

El gen de FGF18 humano codifica un polipéptido de 207 aminoácidos. La secuencia de longitud completa incluye un péptido señal de 27 aminoácidos, como se muestra en SEC ID N°: 3 y 4 y una proteína madura de 180 aminoácidos que comprende del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala). FGF18 truncada (trFGF18) comprende el fragmento desde el resto 28 (Glu) al 196 (Lys) con una Met N-terminal añadida. La secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 3 (nucleótidos de SEC ID N°: 1 1495-2040) y SEC ID N°: 5 (nucleótidos de SEC ID N°: 2 1494-2007) muestra las secuencias con codones optimizados que quedan dentro del alcance de la presente invención.

La producción de FGF18 o trFGF18 recombinante que utilizó un sistema de expresión de mamíferos produce aproximadamente 20 mg/l de proteína. Por lo tanto, era deseable un sistema de expresión más rentable para producción a gran escala de FGF18 o trFGF18. Se descubrió que el sistema de *E. coli* era una mejor alternativa para producción a gran escala. La expresión en *E. coli* ofrece numerosas ventajas frente a otros sistemas de expresión, particularmente bajos costes de desarrollo y altos rendimientos de producción.

Se aisló FGF18 o trFGF18 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión insolubles después de rotura celular. En la mayoría de los casos los cuerpos de inclusión debían solubilizarse en disolvente caotrópico desnaturalizante y la proteína replegada por dilución del agente caotrópico seguido de purificación. Las proteínas varían en gran medida con respecto a su ambiente de replegamiento óptimo. Los factores que pueden afectar a la recuperación de material biológicamente activo y plegado de forma apropiada incluyen: concentración proteica inicial, estado oxidativo, pH, excipientes, sales, detergentes, temperatura, modo de adición del tampón de replegamiento y similares.

La examinación de los codones usados en el ADNc de FGF18 humano indicó que contenía un exceso de los codones usados de forma menos frecuente en *E. coli*. Los genes con un alto contenido de codones usados en pocas ocasiones tienden a expresarse a un nivel bajo en *E. coli* (Kane, Curr Opin Biotechnol. 6(5):494-500, 1995). Una preocupación adicional con relación a la expresión de FGF18 humana en *E. coli* fue la aparición de ocho sitios de escisión de OmpT potenciales localizados en la secuencia de FGF18. OmpT es una endopeptidasa que escinde específicamente entre dos restos básicos consecutivos y la enzima está activa en condiciones desnaturalizantes tales como urea 8 M y guanidina-HCl 6 M (White y col, J Biol Chem, 270 (22): 12990-4, 1995; Dekker y col, Biochemistry 40 (6): 1694-701, 2001). Pareció que el sitio más cercano al extremo C-terminal de la proteína era particularmente susceptible a escisión. Esto plantea preocupaciones con respecto a la estabilidad de FGF18 de longitud completa en un extracto celular de *E. coli* debido a la actividad proteolítica de OmpT.

Varios laboratorios han mostrado que el nivel de expresión de proteínas cuyos genes contienen codones poco comunes pueden mejorarse dramáticamente cuando el nivel de ciertos ARNt poco comunes se aumenta dentro del huésped (Zdanovsky y col, Appl Environ Microbiol. 66(8): 3166-73, 2000; Calderone y col, J Mol Biol. 262(4): 407-12; Kleber-Janke y col, Protein Expr Purif. 19(3): 419-24, 2000; You y col, Biotechniques. 27(5): 950-4 1999). Un enfoque alternativo es obtener por ingeniería genética la secuencia de nucleótidos para aprovechar la redundancia del código genético y no requerir más la utilización de los codones poco comunes. Debido a que estos codones poco comunes estaban en grandes cantidades en FGF18, los presentes inventores resintetizaron tanto el gen de FGF18 como el gen de trFGF18 con codones más apropiados.

La presente invención proporciona un vector de expresión como se define en las reivindicaciones que comprende la secuencia codificante de FGF18 con codones optimizados para la traducción en *E. coli*. También proporciona un vector de expresión como se define en las reivindicaciones que comprende la secuencia codificante de una FGF18 truncada con codones optimizados para la traducción en *E. coli*. El gen sintético que codifica trFGF18 se obtuvo por PCR optimizada. El producto de PCR final se introdujo en un vector de expresión para expresión bajo el control del promotor Tac. Un examen de la estructura secundaria del ADNc de trFGF18 reveló una estructura de dos horquillas excepcionalmente estable. Se sospechó que estos bucles en horquilla eran un elemento estructural que evitaría la

expresión eficaz de la secuencia completamente optimizada. Por lo tanto, las estructuras en horquilla se eliminaron durante el proceso de optimización de codones. El gen resultante se expresó en *E. coli* a altos niveles. Los niveles de expresión con la nueva construcción de expresión aumentaron a aproximadamente 20 % de la proteína celular total o 100 mg/l.

- 5 Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína deseada en células procariotas comprenden típicamente (1) elementos de ADN procariotas que codifican un origen bacteriano para el mantenimiento del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN que controlan el inicio de la transcripción, tales como un promotor; (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de transcritos, tales como un terminador transcripcional y (4) un gen que codifica un marcador seleccionable, tal como resistencia a antibióticos. La célula huésped procariota produce FGF18 o trFGF18 tras la introducción de un vector de expresión y la adición de un inductor apropiado. En consecuencia, la presente invención contempla vectores de expresión que comprenden un promotor, la secuencia de nucleótidos optimizada de FGF18 o trFGF18 y una secuencia terminadora. La secuencia de nucleótidos de FGF18 optimizada ejemplar se muestra en SEC ID N°: 3, mientras que la secuencia de trFGF18 optimizada ejemplar se muestra en SEC ID N°: 5. En otra realización, el vector de expresión comprende adicionalmente un marcador seleccionable. En una realización, el marcador seleccionable es resistencia a kanamicina.

Los vectores de expresión también pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican un marcador peptídico para ayudar a la purificación de la proteína deseada. Los marcadores peptídicos que son útiles para aislar polipéptidos recombinantes incluyen, por ejemplo, marcadores de polihistidina (que tienen una afinidad con la resina quelante de níquel), marcadores de c-myc, proteína de unión a calmodulina (aislada con cromatografía de afinidad con calmodulina), sustancia P, el marcador RYIRS (que se une con anticuerpos anti-RYIRS), el marcador Glu-Glu y el marcador FLAG (que se une a anticuerpos anti-FLAG). Véase, por ejemplo, Luo y col., Arch. Biochem. Biophys. 329:215 (1996), Morganti y col, Biotechnol. Appl. Biochem. 23:67 (1996), y Zheng y col, Gene 186:55 (1997). Están disponibles moléculas de ácido nucleico que codifican tales marcadores peptídicos, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

Un experto en la materia estará familiarizado con una multitud de técnicas moleculares para la preparación del vector de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido de FGF18 o trFGF18 puede prepararse sintetizando moléculas de ácido nucleico usando oligonucleótidos largos mutuamente cebadores y las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang y col, Plant Molec. Biol. 21: 1131 (1993), Bambot y col, PCR Methods and Applications 2:266 (1993), Dillon y col, "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en Methods Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268 (Humana Press, Inc.1993), y Holowachuk y col, PCR Methods Appl. 4:299 (1995)).

Otro procedimiento para construir sistemas de expresión utiliza recombinación homóloga usando un sistema de levadura. Véase Patente de Estados Unidos N° 6.207.442, construcción de plásmido por recombinación homóloga. El sistema proporciona un plásmido aceptor universal que puede usarse para clonar un ADN que codifica cualquier polipéptido de interés, incluyendo fusiones de polipéptidos. El sistema proporciona procedimientos para moléculas de ADN circulares bicatenarias polipeptídicas que comprenden una región que codifica una proteína de interés. Uno o más fragmentos de ADN donadores que codifican la proteína de interés, es decir, FGF18 o trFGF18, se combinan con un plásmido aceptor, un primer engarce de ADN y un segundo engarce de ADN en una célula huésped de *Saccharomyces cerevisiae* por lo que el fragmento de ADN donador se une al plásmido aceptor por recombinación homóloga del ADN donador, plásmido aceptor y engarces para formar el plásmido circular cerrado.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento también pueden sintetizarse con "máquinas génicas" usando protocolos tales como el procedimiento de fosforamidita. Si se sintetiza químicamente, se requiere ADN bicatenario para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento génico, después se prepara cada cadena complementaria de forma separada. La producción de genes cortos (de 60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y puede conseguirse sintetizando las hebras complementarias y después hibridándolas. Para la producción de genes más largos (>300 pares de bases), sin embargo, pueden requerirse estrategias especiales, debido a que la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis de ADN química casi nunca es 100 %. Para superar este problema, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular de fragmentos monocatenarios que son de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones sobre la síntesis polinucleotídica, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura y col, Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984), y Climie y col, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 87:633 (1990).

Los ejemplos de técnicas alternativas que pueden usarse para preparar el gen de FGF18 o trFGF18 y vector de expresión incluyen, por ejemplo, digestión y ligación con endonucleasa de restricción y reacción en cadena de la polimerasa, todas las cuales se conocen bien en la materia.

Está disponible una amplia diversidad de genes marcadores seleccionables (véase, por ejemplo, Kaufman, Meth. Enzymol. 185:487 (1990); Kaufman, Meth. Enzymol. 185:537 (1990)). Es habitual para los vectores de expresión

comprender marcadores de selección, tales como resistencia a tetraciclina, resistencia a ampicilina, resistencia a kanamicina, resistencia a neomicina o resistencia a cloranfenicol. Un marcador seleccionable permitirá la selección y/o detección de células que se han transformado con vectores de expresión de células que no se han transformado. Un vector de expresión puede portar más de un gen de resistencia a antibióticos tal. Un ejemplo de marcador seleccionable sin resistencia a antibióticos usa el sistema *hok/sok* del plásmido R1. El gen *hok* codifica la proteína Hok tóxica de 52 aminoácidos y el gen *sok* codifica un ARN antisentido, que es complementario a la secuencia líder de ARNm de *hok*. Este marcador seleccionable se conoce por un experto en la materia y se describe en más detalle en Gerdes, K. y col, Genetic Engineering. 19:49-61, 1997.

Una amplia diversidad de células huésped recombinantes adecuadas está abarcada por la presente invención e incluye, pero sin limitación organismos huésped procariotas Gram-negativos. Las cepas adecuadas de *E. coli* incluyen W3110, cepas derivadas de K12, MM294, TG-1, JM-107, BL21 y UT5600. Otras cepas adecuadas incluyen: BL21(DE3), BL21 pLysS (DE3), BL21 (DE3) pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110; K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 C600, *E. coli* HB101, *E. coli* K12 C600 R.sub.k - M.sub.k - *E. coli* K12 RR1 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991)). Otros huéspedes procariotas gram-negativos pueden incluir *Serratia*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*. Los huéspedes procariotas pueden incluir organismos Gram-positivos tales como *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, y *thuringiensis B. var israelensis*, así como *Streptomyces*, por ejemplo, *S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. noursei* y *S. griseofuscus*. Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods" en DNAS Cloning: A Practical Approach Glover (ed.) (IRL Press 1985)). Las técnicas convencionales para propagar vectores en huéspedes procariotas se conocen bien por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel y col (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (John Wiley & Sons 1995); Wu y col, Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, Inc. 1997)). Para una visión de conjunto de cepas deficientes en proteasa en procariotas, véase, Meerman y col, Biotechnology 12:1107-1110, 1994. La presente invención se ejemplifica usando la cepa W3110, que se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como ATCC N° 27325.

Se desvelan técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en una diversidad de células huésped en Sambrook y col, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 y Ausubel y col, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Inc., NY, 1987. Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células huésped seleccionadas. Se conoce en la técnica una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener tales componentes como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento generalmente seleccionará células que contienen el ADN añadido de forma exógena mediante, por ejemplo, selección por fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa por el marcador seleccionable portado en el vector de expresión o co-transfectado en la célula huésped. Se proporcionan cultivos líquidos con suficiente aireación por medios convencionales, tales como agitación de frascos pequeños o lavado de fermentadores. Las células transformadas pueden seleccionarse y propagarse para proporcionar células huésped recombinantes que expresan el gen de interés. FGF18 o trFGF18 pueden expresarse en *E. coli* usando el sistema de fusión de MBP (proteína de unión a maltosa) (New England Biolabs (NEB; Beverly, MA)). En este sistema, el ADNc de FGF18 o trFGF18 se une al extremo 3' del gen *malE* para formar una proteína de fusión MBP-FGF18 o MBP-trFGF18. La expresión de proteína de fusión se dirige por el promotor *tac* y está "inactivada" hasta que el promotor se induce por adición de 1 mmol de IPTG. Las construcciones pueden construirse como fusiones en fase con MBP de acuerdo con el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pMAL-c2 (NEB), y de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Fermentación

En una realización de la presente invención puede usarse una fermentación discontinua, particularmente cuando se requiere una producción a gran escala de FGF18 o trFGF18 usando el sistema de expresión de la presente invención. Generalmente, la fermentación discontinua comprende que se prepare un matraz de siembra de primera etapa cultivando cepas de *E. coli* que expresan FGF18 o trFGF18 en un medio adecuado en un cultivo en matraz de agitación para permitir el crecimiento a una densidad óptica (DO) de 5 a 20 a 600 nm. Un medio adecuado contendría nitrógeno de una fuente o fuentes tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio, extracto de levadura, proteínas animales hidrolizadas, proteínas vegetales hidrolizadas o caseínas hidrolizadas. Se proporcionará fosfato de fosfato potásico, fosfato de amonio, ácido fosfórico o fosfato sódico. Otros componentes serían cloruro magnésico o sulfato magnésico, sulfato férrico o cloruro férrico y otros oligoelementos. El medio de crecimiento puede complementarse con carbohidratos, tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa y glicerol para mejorar el crecimiento. Ciertas realizaciones, las adiciones de carbohidratos serían glicerol o glucosa añadidos de 1 a 20 g/l de medio. En ciertas realizaciones, el glicerol o glucosa es 5-10 g/l. El crecimiento se inicia inoculando un matraz en agitación (matraz graduado de 500 ml a 2.000 ml) que contiene un medio de crecimiento preferido con *E. coli* de un medio de agar que contiene antibióticos, por ejemplo kanamicina a 10-50 µg/ml, a la concentración apropiada o de un cultivo madre congelado. El crecimiento en los matraces de agitación es a una temperatura entre

28 y 40 °C. En ciertas realizaciones, los matraces de agitación se cultivan de 30 a 37 °C. Los matraces se incuban con agitación ajustada a 200 a 300 rpm.

Se preparan recipientes de fermentación con un medio de crecimiento adecuado y se esterilizan. El pH del medio se ajusta a pH de 6,5 a 7,5. En ciertas realizaciones, el pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 ó 7,2. Los recipientes se ajustan a los niveles de agitación y aireación apropiados y se inoculan a partir de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa que se ha cultivado de 10 a 20 horas y tiene una DO de 5 a 20 a 600 nm. El nivel de inoculación es entre 1 % y 12 % de volumen/volumen (v/v). En ciertas realizaciones, el nivel de inoculación es a 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la tasa de aireación, el lavado en oxígeno o diversas combinaciones. El cultivo se deja crecer hasta que la DO 600 alcanza de 2 a 20 unidades de DO. Después se añade IPTG al cultivo a una concentración de 0,1 a 0,2 mM. El IPTG induce al promotor *tac* para expresar la FGF18 o trFGF18. Como alternativa, puede añadirse lactosa al 30 % en solución a 10 g/l a las 24 horas para inducción. Se permite después que el cultivo crezca durante un tiempo adicional entre 2 y 8 horas. En ciertas realizaciones, el cultivo se deja crecer durante 3-4 horas.

En otra realización, se usa un cultivo semicontinuo para generar un alto rendimiento de proteína FGF18 o trFGF18. Se cultivan las cepas de *E. coli* productoras de FGF18 o trFGF18 en un medio adecuado en cultivo en matraz de agitación para permitir el crecimiento a una DO de 5 a 20 a 600 nm. Un medio adecuado contendría nitrógeno de una fuente o fuentes tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio, extracto de levadura, proteínas animales hidrolizadas, proteínas vegetales hidrolizadas o caseínas hidrolizadas. Se proporcionará fosfato de fosfato potásico, fosfato de amonio, ácido fosfórico o fosfato sódico. Otros componentes serían cloruro magnésico o sulfato magnésico, sulfato férrico o cloruro férrico y otros oligoelementos. El medio de crecimiento puede complementarse con carbohidratos tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa y glicerol para mejorar el crecimiento. Ciertas realizaciones, las adiciones de carbohidratos serían glicerol o glucosa añadidos de 1 a 40 g/l medio. En una realización, el glicerol o glucosa es 5-10 g/l. El crecimiento se inicia inoculando un matraz de agitación (matraz graduado de 500 ml a 2.000 ml) que contiene un medio de crecimiento preferido con *E. coli* de un medio de agar que contiene kanamicina (10-50 µg/ml) o de un cultivo madre congelado. El crecimiento en los matraces de agitación es a una temperatura entre 28 y 40 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura de crecimiento es de 30 a 37 °C. Los matraces se incuban con agitación ajustada a 200 a 300 rpm.

Se prepara un frasco de segunda etapa con un medio de crecimiento adecuado y se esteriliza. Un medio adecuado sería, por ejemplo, Super Broth II (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ), APS-Super Broth, Luria Broth o ZSM (véase, Tablas 1-4) y kanamicina. El medio de crecimiento puede complementarse con carbohidratos para mejorar el crecimiento. Ciertas realizaciones proporcionan adiciones de carbohidratos que tienen glicerol o glucosa añadidos de 1 a 40 g/l de medio. En una realización, el glicerol o glucosa es 5-10 g/l. El pH del medio se ajusta a un pH de 6,5 a 7,5. En ciertas realizaciones, el pH es 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 ó 7,2. Los recipientes se ajustan a los niveles de aireación y agitación apropiados. El crecimiento se inicia inoculando el recipiente de un cultivo en matraz de siembra de primera etapa que se ha dejado crecer de 10 a 20 horas y tiene una DO de 5 a 20 a 600 nm. El nivel de inoculación es de 1 % a 12 % (v/v). En ciertas realizaciones, el nivel de inducción será 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la tasa de aireación, lavando en oxígeno o diversas combinaciones de los mismos.

Se preparan vasos de fermentación con un medio de crecimiento adecuado (como se ha descrito anteriormente) y se esteriliza. El pH del medio se ajusta a un pH entre 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 ó 7,2. En una realización, el medio se ajusta a pH 6,8. El medio de crecimiento puede complementarse con carbohidratos para mejorar el crecimiento. En algunas realizaciones, las adiciones de carbohidratos son glicerol o glucosa añadida de 5 a 40 g/l de medio con ciertas realizaciones que tienen glicerol o glucosa a 15-20 g/l. Los recipientes se ajustan a los niveles de aireación y agitación apropiados y se inoculan de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa o recipiente de siembra de segunda etapa que se ha dejado crecer de 10 a 20 horas y tiene una DO de 5 a 20 a 600 nm. El nivel de inoculación es entre 1 % y 12 % v/v. En ciertas realizaciones, el nivel de inoculación es 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la tasa de aireación, lavando en oxígeno o diversas combinaciones de los mismos.

Se suministra una solución de carbohidratos al fermentador a una tasa predeterminada comenzando al comienzo del ciclo de fermentación, pero generalmente después de 6 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT) y no más de 12 horas EFT. El suministro se continúa hasta el final de la fermentación. La solución de suministro puede ser glicerol preparado a 40-70 % v/v o glucosa preparada a 40-70 % peso/volumen (p/v). En ciertas realizaciones, se prepara glicerol o glucosa a glicerol 70 % v/v y glucosa a 60 % p/v. Las tasas de suministro pueden variar entre 5 y 15 g de glucosa o glicerol por litro por hora. En una realización la tasa de suministro es 8, 9 ó 10 g/l/hora. A un tiempo de 20 a 30 horas EFT, por ejemplo a 24 horas, se añade IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 a 2 mM. Como alternativa, puede añadirse lactosa a una solución al 30 % a 10 g/l a las 24 horas para inducción. En un tiempo de 48 a 56 horas EFT, se recoge la fermentación. Como alternativa, se añade IPTG adicional de 0,5 a 2 mmol/l al cultivo de fermentador. La fermentación se recoge después a 52 a 56 horas EFT.

Al final del ciclo de fermentación la temperatura se ajusta hacia abajo de 4 °C a 20 °C y el pH se mantiene o se

ajusta a 5,0 a 9,0. En ciertas realizaciones, el intervalo es de 6,0 a 8,0 unidades de pH. El caldo de fermentación se recoge por sobre-presurización del recipiente y recogida del caldo a través del orificio de muestra. Como alternativa, el caldo puede bombearse fuera a través de uno de los orificios de muestra. El caldo de fermentación puede contener sólidos 10 %-30 % p/v.

5 Recuperación de FGF18 o trFGF18

Después de la fermentación las células se recogen por centrifugación, se resuspenden en tampón de homogenización y se homogenizan, por ejemplo, en un homogeneizador APV-Gaulin (Invensys APV, Tonawanda, Nueva York) u otro tipo de equipamiento de ruptura celular tal como molinos de perlas y sonicadores. Como alternativa, las células se toman directamente del fermentador y se homogenizan en un homogeneizador APV-Gaulin. Como alternativa, el caldo de fermentación puede diluirse con agua o tampón antes de la homogenización.

En una realización, las células se homogenizan directamente en el caldo de fermentación. Por ejemplo, se enfría un homogeneizador APV-Gaulin 1.000 o APV-Gaulin 2.000 a 4 °-15 °C durante al menos 30 minutos. El caldo de fermentación se pasa a través del homogeneizador y se recoge la suspensión celular. La presión del homogeneizador debería ajustarse de 41,36 MPa a 96,50 MPa para la máxima rotura celular. En una realización, la presión se ajusta a 68,93 MPa. La suspensión se pasa a través del homogeneizador entre 1 y 5 veces, por ejemplo, 3 pases. En otra realización, el caldo se diluye con un volumen igual de agua antes de la homogenización. La cantidad de ADN puede reducirse mediante la adición de PEI, espermina o benzonasa durante o después de la etapa de homogeneización.

El homogenizado se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se obtiene después de decantar el sobrenadante. El sedimento de cuerpos de inclusión se lava en agua o tampones Tris con o sin niveles variantes de los siguientes compuestos: cloruro sódico, urea, Tritón X-100, cloruro de zinc, lauril sulfato sódico, sacarosa.

En otra realización, las células se recogen transfiriendo el caldo de fermentación para centrifugar frascos y centrifugando a 2-8 °C durante 20-60 minutos. Por ejemplo, puede usarse una centrífuga Beckman J6MI con rotor KompSpin KAJ7.100 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 7.500 x G para recoger células. También puede usarse una centrífuga Beckman Avanti JHC con un rotor de ángulo fijo Beckman JLA-8.1 (8.000 -15.800 x G) o un Rotor Flotante Aries JS 5.0 con frascos de 2,25 l a 7.500 X G. También puede usarse una centrífuga continua tal como las proporcionadas por Carr Separations, Inc. (Franklin, MA) o Westfalia Separator, Inc. (Northvale, NJ).

El caldo de cultivo o sobrenadante se retira de los frascos de centrifuga. Los sedimentos celulares se resuspenden en tampón de homogenización (Tris 100 mM, ZnCl₂ 5 mM, pH 7,5) con sólidos 10-30 % p/v. El caldo de fermentación se pasa a través del homogeneizador APV-Gaulin y se recoge la suspensión celular. La presión del homogeneizador debería ajustarse a de 41,37 MPa a 96,53 MPa para rotura celular máxima. En una realización, la presión es 68,93 MPa. La suspensión se pasa a través del homogeneizador durante 1-5 pases, por ejemplo, 3 pases.

Adicionalmente, los procedimientos de recuperar FGF18 o trFGF18 pueden comprender una etapa adicional de precipitar, lavar y resolubilizar la FGF18 o trFGF18. Los cuerpos de inclusión lavados se solubilizan en guanidina 6M o urea 8 M, se diluyen 6-10 veces en agua o tampón, se incuban durante 30 minutos y se centrifugan o filtran. Como alternativa, puede usarse ultrafiltración o macrofiltración para lavar cuerpos de inclusión después de la homogeneización. El precipitado resultante se lava en urea 2-6 M y contiene la proteína FGF18 o trFGF18. El precipitado se lava después con agua antes de la solubilización. Puede añadirse adición de Al³⁺ o F³⁺ o polímeros aniónicos y catiónicos o agente tal como espermina, PEI y benzonasa para precipitar residuos celulares, proteínas solubles, ADN, ARN y carbohidratos.

Solubilización de cuerpos de inclusión

La preparación de cuerpos de inclusión lavados puede solubilizarse usando clorhidrato de guanidina (5-8 M), tiocianato de guanidina (5-6 M) o urea (7-8 M) que contienen un agente reductor tal como beta mercaptoetanol (10-100 mM) o ditiotretitol (5-50 mM). Las soluciones pueden prepararse en tampones Tris, fosfato, HEPES u otros apropiados. Los cuerpos de inclusión también pueden solubilizarse con urea (2-4 M) que contiene lauril sulfato sódico (0,1-2 %). Pueden solubilizarse cuerpos de inclusión de 1 litro de caldo de fermentación usando 50-200 ml de las soluciones descritas. El procedimiento proporciona solubilización de los sedimentos de cuerpos de inclusión de 1 litro de caldo de fermentación en 150 ml de GuHCl 6 M preparado en Tris 100 mM, pH 8,0, que contiene DTT 40 mM. En otra realización, se mezcla una suspensión de cuerpos de inclusión con 50-100 ml de GuHCl 8 M. La suspensión se resuspende mezclando con una espátula seguido de homogeneización con un homogeneizador Omni EZ (Omni International, Warrenton, VA) o mezclando con un dispositivo mecánico. La suspensión se mezcla durante 30-120 minutos, a 3-37 °C. En una la suspensión se mezcla a 15-25 °C para finalizar el procedimiento de solubilización. La muestra se centrifuga después a 7.500 - 16.000 x G a 4 °C durante 10-30 minutos usando una centrífuga apropiada. La muestra de sobrenadante que contiene la FGF18 o trFGF18 solubilizada se decanta y se conserva.

La concentración de la FGF18 o trFGF18 en la fracción solubilizada se determina por HPLC de fase inversa. Se usa una columna Jupiter C5 (Phenomenex, Torrance, CA) con acetonitrilo/ácido trifluoroacético como la fase móvil. Se diluye patrón de FGF18 o trFGF18 en un tampón que contiene guanidina/DTT/Tris y se inyectan diferentes

cantidades en la columna. El área bajo el pico de FGF18 o trFGF18 se usa para construir una curva patrón. La muestra de FGF18 o trFGF18 solubilizada se microcentrifuga para retirar partículas antes de la inyección en la columna de HPLC. La determinación del área bajo el pico de FGF18 o trFGF18 permite la cuantificación de la concentración de FGF18 o trFGF18 de la curva patrón.

- 5 Adicionalmente, FGF18 o trFGF18 solubilizada puede purificarse en esta etapa usando filtración de flujo tangencial, HPLC de fase inversa de cromatografía de afinidad metálica inmovilizada.

Replegamiento

10 En un aspecto de la invención, el procedimiento para recuperar FGF18 o trFGF18 purificada de cepas huésped de *E. coli* transformadas en las que se expresa la FGF18 o trFGF18 como cuerpos de inclusión refráctiles, las células se rompen y los cuerpos de inclusión se recuperan por centrifugación.

15 Los cuerpos de inclusión se solubilizan después y desnaturalizan en TRIS 50 mM pH 8 y clorhidrato de guanidina 6 M que contiene un agente reductor. La FGF18 o trFGF18 reducida se oxida después en una etapa de renaturalización controlada. Esta etapa implica la dilución en un tampón de replegamiento que comprende Tris 50 mM y NaCl 120 mM. Este tampón también puede comprender clorhidrato de arginina, sales adicionales y un sistema de redistribución de óxido, aunque estos componentes no son necesarios para el replegamiento exitoso de FGF18 o trFGF18. El sistema de redistribución de óxido se usa para iniciar el enlace bisulfuro de la molécula de FGF18 o trFGF18 y se basa en mezclas de moléculas reducidas y oxidadas tales como cisteína y cistina, DTT y cistina, glutatión reducido y glutatión oxidado y DTT y glutatión oxidado. La relación de glutatión reducido y oxidado puede variar de 1:1 a 6:1 con un intervalo de concentración de 0,5 y 8 mM. En una realización, la concentración óptima es glutatión reducido 4 mM: glutatión oxidado 2 mM. La relación de cisteína a cistina puede variar de 2:1 a 1:1 con un intervalo de concentración de 4 mM a 1 mM de cualquiera de los reactivos. En una realización, la concentración óptima es cisteína 4 mM, con cistina 2 mM. También puede conseguirse replegamiento óptimo usando cistina 4 mM y DTT 2 mM que forma cisteína 4 mM y cistina 2 mM. El replegamiento también puede realizarse por sulfitolisis en presencia de reactivos tales como sulfito sódico y tetratiónato sódico. Este proceso "protege" las cisteínas libres. Debido a que FGF18 o trFGF18 contiene solamente un enlace disulfuro, esta etapa no es generalmente necesaria para el replegamiento exitoso de FGF18 o trFGF18. La FGF18 o trFGF18 renaturalizada se captura del tampón de replegamiento diluido usando cromatografía de intercambio catiónico y se purifica usando cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento.

30 La solución que contiene FGF18 o trFGF18 se añade rápidamente (1-5 minutos) o lentamente (0,5-5 horas) al tampón de replegamiento con mezcla. El tampón de replegamiento contiene Tris y NaCl pero también puede comprender arginina (0,5 a 1,25 M), PEG y otras sales. También puede incluir glicerol, guanidina, HCl, urea, EDTA, inhibidores de proteasa y chaperonas, alcohol, detergentes, glicerol y sulfato de cobre. La FGF18 o trFGF18 puede añadirse en una adición, en múltiples adiciones o suministrarse a lo largo del tiempo. La FGF18 o trFGF18 se añade a la mezcla de replegamiento a una concentración final de 0,5 a 1,2 mg/ml. El intervalo de temperatura es de 4-30 °C. El pH es de 7,3 a 8,5. El recipiente que contiene la mezcla de replegamiento se deja abierto a la atmósfera o puede lavarse con aire o nitrógeno durante la renaturalización. Se permite que el replegamiento tenga lugar de 1 a 26 horas. En particular, en realizaciones específicas de la invención, el tiempo de replegamiento es de 5 a 20 horas, 10 a 20 horas, 15 a 18 horas o aproximadamente 18 horas.

40 También puede realizarse replegamiento en presencia de EDTA para reducir la oscilación de metionina o en una columna de exclusión por tamaño o usando filtración de flujo tangencial o electrodiálisis.

Clarificación y concentración de FGF18 o trFGF18 replegada

45 Se pasa FGF18 o trFGF18 replegada a través de un filtro de 1,2 µm para clarificación y retirada de proteína insoluble. Debido a que FGF18 o trFGF18 tienen un alto PI, una caída del pH generalmente no es necesaria para clarificar y concentrar las proteínas. La solución filtrada se concentra 10-30 veces usando filtración de flujo tangencial en una placa y sistema de bastidor o con un cartucho de fibra hueca. El concentrado se diluye después 3-10 veces con tampón o agua para permitir que las proteínas agregadas y no plegadas precipiten. La solución se pasa después a través de un filtro para clarificación y retirada de proteína insoluble.

Sorprendentemente, FGF18 o trFGF18 puede replegarse sin el uso de arginina, aunque no se esperaría que su presencia afecte de forma adversa al proceso.

50 Captura de FGF18 o trFGF18

55 En otro aspecto de la presente invención, después de que la proteína FGF18 o trFGF18 se repliegue y concentre, los procedimientos de la presente invención comprenden capturar la proteína FGF18 o trFGF18 plegada en tampón diluido en una columna de intercambio catiónico y purificar proteína FGF18 o trFGF18 usando cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento como se define en las reivindicaciones.

La etapa de captura se diseña para capturar la FGF18 o trFGF18 plegada, diluida y llevar a cabo purificación inicial.

La FGF18 o trFGF18 diluida clarificada se captura en una columna de intercambio catiónico a pH 8,0. Típicamente, se usa SP Sepharose XL Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) o TOYOPEARL SP 550C (Tosoh Biosep, Montgomery, PA). El tampón de equilibrio es el mismo que el tampón de replegamiento descrito anteriormente y la FGF18 o trFGF18 unida se diluye con un gradiente salino creciente. FGF18 o trFGF18 eluye de la SP Sepharose XL usando una etapa de NaCl o gradiente de NaCl.

También puede usarse cromatografía de lecho expandido para captura de FGF18 o trFGF18 después del replegamiento. En ese caso la etapa de dilución se lleva a cabo en línea mientras se carga la FGF18 o trFGF18 en la columna. La Streamline SP XL (Amersham Biosciences) se equilibra con tampón de replegamiento. Se carga después FGF18 o trFGF18 en modo de flujo ascendente en la resina Streamline SP XL equilibrada, que se mantiene al doble de la altura del lecho sedimentado, mientras se diluye 1:3 en línea con agua. Después del lavado en los modos de flujo ascendente y flujo descendente, se eluye FGF18 o trFGF18 en modo de flujo descendente con una etapa de NaCl o un gradiente de NaCl.

Los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de muchas resinas de intercambio catiónico diferentes para esta etapa, incluyendo intercambiadores de cationes débiles tales como carboximetilo, diferentes tipos de soportes sólidos tales como agarosa o celulosa y diferentes tamaños de partícula. Los procedimientos de la presente invención también pueden proporcionar ejecutar las columnas a diferentes pH en el intervalo de 5,0 a 9,0 y con diferentes tampones y sales. Como alternativa, pueden usarse otros procedimientos cromatográficos tales como interacción hidrófoba, intercambio aniónico y quelado metálico para capturar la FGF18 o trFGF18 replegada.

Purificación

En un aspecto de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, hay una purificación intermedia de proteína FGF18 o trFGF18. Esta etapa se diseña para conseguir purificación adicional de la FGF18 o trFGF18 usando cromatografía de interacción hidrófoba. Típicamente butil sepharose FF (Amersham Biosciences) de TOYOPEARL butil 650 M (Tosoh Biosep) son resinas usadas para esta etapa. La resina se equilibra con Tris 50 mM, NaCl 1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M, pH 8,0. La FGF18 o trFGF18 que se ha purificado por cromatografía de intercambio catiónico se ajusta a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M y después se pasa a través de un filtro nominal de 0,45 μm . La FGF18 o trFGF18 ajustada y filtrada se carga después en la resina equilibrada, que después se lava con tampón de equilibrio para retirar material no unido. FGF18 o trFGF18 se eluye con un gradiente lineal de PBS (Na_2HPO_4 7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) y tampón de equilibrio. FGF18 o trFGF18 eluye de la columna a aproximadamente 120 mS/cm.

Otras resinas de cromatografía de interacción hidrófoba que pueden usarse para esta etapa incluyen, por ejemplo, las sustituidas con fenilo o hexilo, diferentes tipos de soportes sólidos tales como agarosa o celulosa y diferentes tamaños de partícula. La presente invención también proporciona ejecutar las columnas a diferentes pH en el intervalo de 5,0 a 9,0 y con diferentes tampones y sales. La presente invención también proporciona ejecutar la columna de tal manera que FGF18 o trFGF18 no se una.

El grupo de eluato de columna final se concentra usando una placa de filtración de flujo tangencial con punto de corte de 5 kDa de peso molecular y membrana de marco, diafiltrada frente a PBS, pH 7,3, descrito anteriormente. Pueden usarse otras membranas, tales como una placa de punto de corte de 3 kDa o 8 kDa de peso molecular y membrana de marco o un sistema de fibra hueca de punto de corte de 10 kDa de peso molecular para conseguir esta etapa de ultrafiltración/diafiltración. La pureza de la FGF18 o trFGF18 después de estos procedimientos es al menos 95 % y típicamente mayor de 98 %, por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico. El nivel de endotoxina en la preparación de FGF18 o trFGF18 después de la captura de cromatografía de intercambio catiónico, purificación de cromatografía de interacción hidrófoba e intercambio de tampón, es generalmente < 10 de unidades de endotoxina por mg de proteína de FGF18 o trFGF18, y típicamente < 2 unidades de endotoxina por mg de proteína FGF18 o trFGF18. El nivel de endotoxina después de la cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento es generalmente < 1 unidad de endotoxina por mg de FGF18 o trFGF18.

Puede ser deseable purificación adicional de FGF18 o trFGF18 para retirar las impurezas y contaminantes restantes. Por ejemplo, puede usarse una columna de intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxina. Se diluye FGF18 o trFGF18 a un nivel de conductividad de < 10 mS/cm y el pH se ajusta a 8,0. Se aplica a una columna de Q Sepharose FF (Amersham Biosciences) que se ha equilibrado a Tris 20 mM, pH 8,0. La FGF18 o trFGF18 pasa a través de la columna y tiene una reducción de aproximadamente 80 % en endotoxina en comparación con la carga. También pueden usarse membranas Mustang Q o Mustang E (Pall, Port Washington, NY) para reducir los niveles de endotoxina entre pH 5,0 y 9,0.

Otras etapas de purificación que podrían usarse potencialmente para purificar adicionalmente FGF18 o trFGF18 incluyen cromatografía de quelado metálico, cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de interacción hidrófoba en una columna de fenilo. También es posible llevar a cabo purificación antes del replegamiento de la FGF18 o trFGF18, usando por ejemplo HPLC de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de quelado metálico. Por lo tanto, la presente invención proporciona adicionalmente procedimientos que comprenden las etapas adicionales de purificación desveladas en el presente documento.

Caracterización de FGF18 o TRFGF18 purificada

- Se conocen bien en la técnica ensayos que miden la proliferación o diferenciación celular. Específicamente, la actividad biológica de FGF18 o trFGF18 puede medirse usando un ensayo de BaF3 o CCC4, descritos en detalle a continuación. Los ensayos bien conocidos adicionales incluyen ensayos que miden la proliferación, incluyendo tales ensayos como quimiosensibilidad a colorante rojo neutro (Cavanaugh y col, Investigational New Drugs 8:347-354, 1990), incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook y col, Analytical BioChem, 179:1-7, 1989), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferativas (Porstmann y col, J. Immunol. Methods 82:169-179, 1985) y uso de sales de tetrazolio (Mosmann, J. Immunol. Methods 65-55, 1983; Alley y col, Cancer Res. 48:589-601, 1988; Marshall y col, Growth Reg. 5:69-84, 1995; y Scudiero y col, Cancer Res 48:4827-4833, 1988).
- Los ensayos que miden diferenciación incluyen, por ejemplo, medir marcadores de superficie celular asociados con expresión específica de etapa de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989). FGF18 o trFGF18 producido por los procedimientos descritos es capaz de estimular la proliferación de células BaF3/FGF18R.
- FGF18 o trFGF18 purificada puede caracterizarse por varios procedimientos físicos. Óptimamente, el análisis de aminoácidos indica que la composición de aminoácidos de todos los restos está dentro del 10 % de los valores esperados. La secuenciación N-terminal proporciona una secuencia sencilla que comienza con metionina y que corresponde a la secuencia predicha del vector de expresión FGF18 o trFGF18. Puede usarse digestión con endoproteinasa Lys C seguido de espectrometría de masas-cromatografía líquida para generar un mapa peptídico en el que todos los picos corresponden en masa a tríptico predicho en FGF18 o trFGF18 y en el que todos los péptidos trípticos predichos de FGF18 o trFGF18 se identifican.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos**Ejemplo 1**

- 25 Construcción del vector de expresión, pTAP237

El plásmido pTAP237 se generó insertando un engarce generado por PCR en el sitio de SmaI de pTAP186 por recombinación homóloga. El plásmido pTAP186 se derivó de los plásmidos pRS316 (un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*) y pMAL-c2, un plásmido de expresión de *E. coli* derivado de pKK223-3 y que comprende el promotor *tac* y el terminador *rmb*. El plásmido pTAP186 contiene un gen de resistencia a kanamicina en el que se ha destruido el sitio de Sma I y tiene sitios NotI y SfiI que flanquean las secuencias de levadura ARS-CEN6 y URA3, facilitando su retirada del plásmido por digestión con NotI. El engarce generado por PCR reemplazó la secuencia acopladora de expresión en pTAP186 con la secuencia de RBS II sintética. Se preparó de 100 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29.740 y zc29.741, como se muestra en SEC ID N° 19 y 20, respectivamente, y aproximadamente 5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29.736 y zc29.738, como se muestra en SEC ID N° 21 y 22, respectivamente. Estos oligonucleótidos se combinaron por PCR durante diez ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de impregnación a 4 °C. Los productos de PCR resultantes se concentraron por precipitación con dos veces el volumen de etanol 100 %. El sedimento se resuspendió en 10 µl de agua para usarse para recombinación en el vector receptor pTAP186 digerido con SmaI para producir la construcción que contiene la secuencia de RBS II sintética. Se mezclaron aproximadamente 1 µg del engarce generado por PCR y 100 ng de pTAP186 digerido con SmaI entre sí y se transformaron en células de levadura competentes (*S. cerevisiae*). La levadura se sembró después en placas URA D y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 72 horas. Después los transformantes Ura + de una placa sencilla se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis. Se recuperó ADN y se transformó en MC1061 de *E. coli*. Los clones se exploraron por PCR de colonias como se ha desvelado anteriormente usando 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29.740 y zc29.741, como se muestra en SEC ID N° 19 y 20, respectivamente. Los clones que presentaban la banda de tamaño correcto en un gel de agarosa se sometieron a análisis de secuencia. El plásmido correcto se designó pTAP237.

Ejemplo 2

- 50 Optimización de codones

La expresión de ensayo de FGF18 humana en *E. coli* produjo niveles menores de lo ideal, así como productos truncados, específicamente truncación de 11 aminoácidos del extremo C terminal de la proteína. Para evaluar el bajo nivel de expresión, la examinación de los codones usados en la secuencia codificante de FGF18 indicó que contenía un exceso de los codones usados menos frecuentemente en *E. coli* con un valor de CAI igual a 0,248. El CAI es una medida estadística de preferencia codónica sinónima y puede usarse para predecir el nivel de producción proteica (Sharp y col, Nucleic Acids Res. 15(3): 1281-95, 1987). Los genes que codifican proteínas altamente expresadas tienden a tener valores de CAI altos (> 0,6), mientras que las proteínas codificadas por genes con valores bajos de CAI (< 0,3) generalmente se expresan de forma ineficaz. Esto sugirió una razón para la

producción baja de FGF18 en *E. coli*.

La producción de productos truncados fue una segunda ineficacia en el procedimiento, que requiere aislamiento de la parte truncada de las proteínas producidas. Una vez que se determinó que la proteína truncada tenía actividad biológica similar, si no idéntica, a la proteína de longitud completa, se construyó una construcción que producía deliberadamente el producto más corto. Específicamente, la proteína se detuvo después del aminoácido 196 (Lys).

Esto dejó el problema del codón. Por lo tanto, se realizó un intento de resintetizar el gen que codificaba FGF18 y trFGP18 con un uso de codón más apropiado que proporciona un vector mejorado para expresión de grandes cantidades de FGF18 o trFGF18.

La secuencia codificante de trFGF18 con codones optimizados se construyó a partir de doce oligonucleótidos solapantes: zc44.349 (SEC ID N°: 7), zc44.350 (SEC ID N°: 8), zc44.351 (SEC ID N°: 9), zc44.352 (SEC ID N°: 10), zc44.355 (SEC ID N°: 11), zc44.356 (SEC ID N°: 12), zu44.357 (SEC ID N°: 13), zc44.358 (SEC ID N°: 14), zc44.359 (SEC ID N°: 15), zc44.360 (SEC ID N°: 16) zc44.361 (SEC ID N°: 17) zc44.362 (SEC ID N°: 18). La extensión de cebadores de estos oligonucleótidos solapantes se siguió de amplificación por PCR de un gen de trFGF18 de longitud completa con codones optimizados para expresión en *E. coli*. El producto de PCR final se insertó en el vector de expresión pTAP237 por recombinación homóloga de levadura. La construcción de expresión se extrajo de levadura y se transformó en DH10B de *E. coli* competente. Los clones con resistencia a kanamicina se identificaron por PCR de colonias. Un clon positivo se secuenció y posteriormente se transformó en tres cepas huésped de producción BL21, W3110 y zGold1. El vector de expresión con la trFGF18 optimizada se nombró pSDH174.

Ejemplo 3

Construcción de pSDH170 y pSDH174

La secuencia codificante de FGF18 humana se generó por amplificación por PCR usando un grupo de biblioteca de ADNc CD3+ como molde y cebadores oligonucleotídicos. Para optimizar el proceso de traducción en *E. coli*, se usó un cebador para añadir un codón de inicio ATG al extremo 5' de las secuencias codificantes de FGF18 maduras. La secuencia génica resultante codificó la FGF18 madura con una metionina extra en el extremo N-terminal. El producto de PCR final se insertó en el vector de expresión pTAP237 (descrito en el ejemplo 1) mediante recombinación homóloga de levadura (Raymond y col. *Biotechniques*. 26(1):134-8, 140-1, 1999; Patente de Estados Unidos 6.027.442). La construcción de expresión, pSDH170 (SEC ID N°: 1), se extrajo de levadura y se transformó en una *E. coli* DH10B competente. Se identificaron clones resistentes a kanamicina mediante PCR de colonias. Se verificó un clon positivo por secuenciación y se transformó posteriormente en cualquier cepa huésped BL21, W3110 y z(GOLD1 (descrita posteriormente).

Ejemplo 4

Expresión de trFGP18

Se inoculó *E. coli* en 100 ml de medio Superbroth II (Becton Dickinson Franklin Lakes NJ) que contenía antiespumante 289 0,01 % (Signal -Adrich, St. Louis. MO) y kanamicina 30 µg/ml y se cultivó durante una noche a 37 °C. Se añadió un inóculo de 10 ml a 500 ml del mismo medio en un matraz de cultivo de 2 l que estaba a 275 rpm a 37 °C hasta que el cultivo obtuvo una DO₆₀₀ de 4. Se añadió después IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó la agitación durante otras 2,5 horas. Las células se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C para su uso en un momento posterior.

Se realizó expresión de trFGF18 a una mayor escala en un cultivo de 25 ml a 37 °C. Se recogió un ml de cultivo 2 horas después de que las células de inducción de IPTG se resuspendieran en un volumen igual de reactivo de extracción de proteína BugBuster® (Novagen, Madison, WI) a 4 °C y se incubara durante 20 minutos. Las fracciones solubles e insolubles se separan por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C.

La trFGF18 recombinante se acumuló como cuerpos de inclusión insolubles. El rendimiento de recuperación de trFGF18 de la mayoría de la cepa de *E. coli* se consideró bajo. Se perdieron aproximadamente de 80 a 90 % de trFGF18 en los cuerpos de inclusión en un período de 20 minutos después de la lisis celular e incubación a 4 °C. La lisis de las bacterias con urea 8 M no mejoró la recuperación. Sin embargo la inclusión de inhibidores de proteasa, tales como ZnCl₂ 5 Mn y benzamidina 0,5 mM, en el tampón de lisis celular evitó la pérdida de trFGF18 de la cepa E104 (W3110 arabinosa⁻). Esto indicó que una proteasa bacteriana capaz de escindir trFGF18 en condiciones desnaturalizantes se copurificaba con los cuerpos de inclusión. Se observó que trFGF18 era estable en lisados celulares de la cepa UT5600, pero no en lisados celulares de E104. Esto sugirió que la proteasa estaba presente en E104 pero no UT5600. La comparación de los genotipos de estas cepas reveló que OmpT, que escinde entre restos dibásicos, estaba presente en E104 pero no en UT5600. OmpT es estable frente al calor y activa incluso en condiciones desnaturalizantes (White y col., igual que en la referencia anterior. 1995). La examinación de la secuencia de aminoácidos de FGF18 indicó que contenía al menos ocho sitios de escisión de OmpT potenciales. trFGF18 también demostró excelente estabilidad en BL21, otra cepa de *E. coli* deficiente en OmpT. Estos datos sugirieron que la actividad proteasa de OmpT era crítica para la estabilidad y recuperación de FGF18. El uso de la cepa de *E. coli* UT5600 como el huésped de producción mejora significa la recuperación de trFGF18. En general los

rendimientos de trFGF18 aumentaron de 2 mg/l a 50-100 mg/l con la combinación de mejora de construcción y cepa huésped.

Ejemplo 5

Caracterización de FGF18

5 La proteína producida por los procedimientos descritos anteriormente puede analizarse con respecto a integridad polipeptídica y actividad biológica usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína puede examinarse usando análisis de Western.

10 Para análisis de Western, las muestras proteicas se separaron en un gel MES-SDS NuPAGE 4-20 % (Invitrogen) en condiciones reductoras y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) a 30 V durante 1 hora. La membrana se bloqueó con leche sin grasa 5 % en tampón TTBS (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 160 mM, Tween 20 0,1 %). Se añadió anticuerpo policlonal específico para FGF18 humana en tampón de TTBS con leche sin grasa 5 % y se incubó durante 1 hora. Después de lavar con TTBS, se exploró la mancha de transferencia con IgG de cabra anti conejo conjugado con HRP (Bio-Rad) durante 1 hora. La mancha de transferencia se lavó posteriormente tres veces con TTBS antes de la detección de quimioluminiscencia con reactivo ECL de Pierce.

15 La actividad de la proteína FGF18 o trFGF18 puede examinarse usando el ensayo BaF3 como se describe en Ellsworth y col, Osteoarthritis Cartilage, 10:308 (2002). Un segundo ensayo es el ensayo CCC4 de línea celular de osteoblastos.

20 Se desarrolló un bioensayo *in vitro* de alto rendimiento para FGF18 usando una línea celular de osteoblastos inmortalizada (CCC4) derivada de ratones knockout P53. Se estableció una línea de osteoblastos P53 que expresaban el sistema indicador de luciferasa-elemento de respuesta a suero (SRE). La línea celular clonal usada se derivó transfectando la línea celular de osteoblastos P53 inmortalizada CCC4 con una construcción indicadora de puromicina/luciferasa-SRE KZ125 y seleccionando con respecto a clones con alta capacidad de inducción de luciferasa por suero, PDGF y bFGF. El ensayo en su formato actual es sensible, reproducible y pueden generarse resultados en un periodo de un día.

25 Se usa CCC4/KZ125 en todos los experimentos.

30	Medio de crecimiento:	alfa-MEM	500 ml
		HIA-FBS 15 %	75 ml
		Na piruvato 1 mM	5 ml
		L-glutamina 2 mM	5 ml
		Puromicina 2 µg/ml	20 µl de reserva de 50 mg/ml

35	Medio de siembra en placas:	alfa-MEM	500 ml
		HIA-FBS 1 %	5 ml
		Na piruvato 1 mM	5 ml
		L-glutamina 2 mM	5 ml

40	Medio de ensayo:	DMEM	500 ml
		BSA 1 %	66,6 ml de BSA 7,5 %
		HEPES 20 mM	10 ml
		Na piruvato 1 mM	5 ml
		L-glutamina 2 mM	5 ml
		(la BSA era de uso en cultivo tisular)	

Mantenimiento de células CCC4: las células se pasaron dos veces semanalmente usando relaciones de separación de 1:10 (confluyentes en 2 días), 1:20 (confluyentes en 3 días), 1:40 (confluyentes en 4 días).

45 Preparación de placas de ensayo: las células se tripsinizan, se resuspenden en medio de crecimiento, después se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspende en medio de siembra en placas, se cuenta en un hemacitómetro, se ajusta a 2×10^5 células/ml y se siembra en placas a 100 µl/pocillo en placas de microtitulación blancas opacas Dynatech Microlite (Dynatech, N° 011-010-7418 y Linbro lids. ICN Biomedical, N° 76-205-05) y se permite que crezcan durante una noche a 37 °C, CO₂ 5 %.

Ensayo de inducción de SRE-Luciferasa:

50 Se diluyen sustancias de ensayo, bFGF y controles de suero en medio de ensayo a una concentración dos veces (2X) la concentración de ensayo deseada final (FAC) y se añaden (100 µl/pocillo) a placas de ensayo para un volumen de ensayo final de 200 µl/pocillo. Si las muestras de ensayo están en DMSO entonces las muestras se diluyen de modo que la FAC de DMSO no exceda 1 % (o DMF 0,25 %). El medio de ensayo, sin sustancias de ensayo o compuestos de control, se añade a 4 pocillos/placa de ensayo para determinar la expresión de luciferasa basal (no inducida) en cada placa. Se añade bFGF a FAC 3 ng/ml a 4 pocillos/placa para determinar la máxima

inducción de luciferasa posible para cada placa. En al menos una placa en cada conjunto de ensayo se realiza una curva de respuesta a dosis de bFGF completa (FAC 0,001 - 10 ng/ml). Si las reservas de sustancia de ensayo están en DMSO (o DMF), entonces se añade DMSO (o DMF) a los controles de bFGF y basal a una concentración de ensayo final (FAC) igual a la de las sustancias de ensayo.

- 5 Las placas se incuban durante 4 horas a 37 °C, CO₂ 5 %. El medio de ensayo se descarga de las placas y se añade tampón de lisis 1 X (25 µl/pocillo) (Promega, N° 1501). Las placas se incuban después durante 15 minutos a temperatura ambiente. (Las placas pueden congelarse en este punto para ensayo posterior de la actividad luciferasa). Se añade el sustrato de luciferasa (Promega, N° E1501) 50 µl/pocillo, usando el luminómetro Labsystems Luminoskan para realizar la adición de sustrato. La señal de luciferasa (RLU) se lee durante 2 segundos/pocillo después de un retardo de 1 segundo.

Cálculo de los datos: Se resta la señal basal media (no inducida) de todas las lecturas y los resultados se expresan como un porcentaje de la inducción máxima producida por bFGF 3 ng/ml. Se calcula la concentración de sustancia de ensayo (en µg/ml para extractos en bruto o µM para compuestos puros) que produce 50 % de la inducción de luciferasa máxima posible (CE50).

- 15 Las curvas patrón típicas para FGF18 humana recombinante derivada de *E. coli* añadida al medio de ensayo se muestran en las Figuras 1 y 2. El intervalo lineal y límite inferior de detección del ensayo son 0-3 ng/ml y -0,2 ng/ml, respectivamente.

Ejemplo 6

Análisis de estabilidad de plásmidos

- 20 Se inoculó *E. coli* en 25 ml de medio Superbroth II (Becton Dickinson) que contenía antiespumante 289 0,01 % (Sigma) y kanamicina 30 µg/ml y se cultivó durante una noche a 37 °C. Se añadieron 25 µl de inóculo a 25 ml del mismo medio sin kanamicina en un matraz de cultivo de 25 ml que se agitó a 275 rpm a 37 °C. Se recogieron 100 µl de cultivo en cuatro puntos temporales diferentes (cuando el cultivo alcanzó valores de DO₆₀₀ de 2, 4, 6 y 8). Las muestras se diluyeron y se sembraron en placas de agar LB sin ningún aditivo. Después de incubación durante una noche a 37 °C, se sembraron en réplica 100 colonias de *E. coli* en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía kanamicina 30 µg/ml. Después de incubación durante una noche de a 37 °C, el número de colonias que se formó en cada placa se contó y se comparó. El número de colonias que crecía en LB más kanamicina en relación con el número que creció en la placa sin antibióticos reflejó el porcentaje de células que aún albergaban el vector de expresión.
- 30 Cuando se cultivaron clones de W3110 o zGOLD1 que portaban el vector de expresión pSDH170 o pSDH174 durante 12 horas en medio que no contenía kanamicina, más del 90 % conservaron el plásmido. Los clones que portaban el vector de expresión sin el gen de FGF18 mostraron retención similar del plásmido. Estos datos demuestran que el vector de expresión pSDH170 o pSDH174 que porta FGF18 o trFGF18 es estable en estas cepas de producción.
- 35 Las cepas de *E. coli*, TG1 y MM294, no se seleccionaron como el huésped de producción debido a baja productividad de FGF18 e inestabilidad plasmídica grave. Los resultados más prometedores vinieron de los estudios que usaban la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC N° 27325) para producir FGF18. La productividad de W3110 era comparable a la de UT5600. Los estudios de estabilidad plasmídica demostraron que el vector de expresión pTAP337, se mantuvo en W3110 también. UT5600 es una cepa auxotrófica y más difícil de cultivar a gran escala.
- 40 Estas consideraciones condujeron a la selección de W3110 como la cepa huésped preferida para producción de FGF18.

Ejemplo 7

Fermentación discontinua

- 45 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con Difco APS Super Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI), complementado con glicerol a 5 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz de agitación con una carga completa de *E. coli* W3110 o zGOLD1 que contenía el vector de expresión pSDH170 o pSDH174 de una placa de agar de 24 horas de edad (agar Luria (Difco Laboratories) que contenía kanamicina 25 µg/ml). El crecimiento en el matraz de agitación fue a una temperatura apropiada (generalmente, 37 °C). El matraz se incubó con agitación ajustada a 250 rpm.
- 50 Se preparó un recipiente de fermentación de 2 l con 2,0 l de Difco APS Super Broth y se esterilizó. El medio de crecimiento se complementó con glicerol a 50 g/l y kanamicina 25 µg/ml más MgSO₄ 1 M 5 ml/l. La aireación del frasco se ajustó a 1 vvm y la agitación se ajustó a 350 rpm. La temperatura se ajustó a 37 °C. El fermentador se inoculó a partir de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa crecido durante 16 horas a una densidad óptica (DO) de 10-20 a 600 nm. La inoculación fue 5 % v/v. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación o utilizando complemento de O₂ si fue necesario, como se conoce
- 55

bien en la técnica.

El cultivo se dejó crecer hasta que la DO_{600} alcanzó 2,5 (aproximadamente 2,5 horas). Se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1,0 mM. Se permitió después que el cultivo creciera durante 2,5 horas adicionales.

Ejemplo 8

5 A. Fermentación semicontinua

Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con Difco APS Super Broth complementado con glicerol a 5 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz de agitación con una carga completa de *E.coli* W3110 o zGOLD1 (descritas posteriormente) que contenía el vector de expresión pSDH170 o pSDH174 (descritos anteriormente) de una placa de agar de 24 horas de edad (agar Luria que contenía kanamicina 25 µg/ml). El matraz de agitación se incubó a 30 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

Se preparó un frasco de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio de crecimiento ZymoM y se esterilizó. El medio de crecimiento se complementó con glicerol a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a pH 6,4. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación a 350 rpm y la temperatura a 32 °C. El fermentador se inoculó a partir de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} de 10-20. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación.

Se suministró una solución de carbohidratos al fermentador comenzando a las 10 horas EFT. El suministro se continuó hasta el final de la fermentación. La solución de suministro fue glicerol preparado al 70 % v/v. La tasa de suministro fue de 6 gramos de glicerol por litro por hora basándose en el volumen de partida inicial. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 2 mM. A las 48 horas EFT, la fermentación se recogió.

En un procedimiento semicontinuo alternativo, se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz en agitación con 300 µl de *E.coli* W3110 congelada en glicerol 20 % y que contenía el vector de expresión pTAP337. El cultivo se incubó a 30 °C con agitación a 250 rpm.

Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio de crecimiento ZymoM y se esterilizó. El medio de crecimiento se complementó con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} de 16. La inoculación fue de 5 % volumen/volumen y el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación.

Se suministró una solución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 10 horas EFT. El suministro se continuó hasta el final de la fermentación. La solución de suministro fue glucosa preparada al 60 % v/v y la tasa de suministro fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen de partida inicial. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 2 mM. A las 48 horas EFT, se añadió IPTG 2 mmol/l al cultivo llevando la concentración de IPTG a 4 mM. La fermentación se recogió a las 56 horas.

Tabla 1

Medio ZSM (matraz de agitación y fermentador de siembra)	
Ingrediente	Can g/l o ml/l
Extracto de levadura	5,0
Sulfato sódico dibásico	2,0
Sulfato de amonio dibásico	2,5
Cloruro de amonio	0,5
Fosfato potásico dibásico	14,6
Fosfato potásico monobásico	3,6
Agua Di	1,0 l
Después de esterilizar en autoclave añadir:	
Glucosa 60 %	20g/l (33 ml)

ES 2 371 219 T3

Medio ZSM (matraz de agitación y fermentador de siembra)	
Ingrediente	Can g/l o ml/l
Sol. Trace D	3 ml
MgSO ₄ 1M	3 ml
Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1,0 ml

Tabla 2

Solución de glucosa 60 % para semicontinua	
Ingrediente	Can g/l
H ₂ O	800 ml
Glucosa	1200 g
<i>Ajustar volumen con H₂O a:</i>	<i>2.0 l</i>
Después de esterilizar por autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1 M (30 ml/l)	60 ml

Tabla 3

ZymoM - (Medio de fermentación semicontinua)	
Ingrediente	Cantidad g/l o ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,0
KH ₂ P ₀ 4	2,0
K ₂ HPO ₄	16,5
Extracto de levadura	5,5
Glicerol	20,0
Antiespumante AF208	0,1 ml
Conc. H ₃ PO ₄	1,5
Agua DI	1,0 l
Después de esterilizar con autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1M	10 ml
Solución Trace D*	17,0 ml
Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1 ml

Tabla 4

Solución Trace "D" (para medios ZymoM y ZSM)	
Ingrediente	Can. g/l
FeC13.6H2O	6,48
ZnSO4.7H2O	1,68
MnCl2.4H2O	1,20
Na2MoO4.2H2O	0,50
CuSO4.5H2O	0,24
H3BO3	0,72
Conc. H3PO4	48,0 ml
dH2O	1,0 l

B. Fermentación semicontinua con medio PCOL22

5 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ISM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado de W3110 o zGOLD1 transformadas de forma estable con psDH170 o pSDH174. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

10 Se preparó un recipiente de fermentación de 2 l con 1,2 l de medio PCOL22 (ZSM más la solución Trace D como se describe posteriormente) y se esterilizó. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa a 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro de cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO₆₀₀ nm de 10-16. La inoculación fue a 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación más complemento de O₂. El pH se controló a 6,8 por adición de NH₄OH 5 N.

15 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 10 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

20 Solución Trace "D" (medio PCOL22)

Ingrediente	Can. g/l
FeCl3.6H2O	3,36
ZnSO4.7H2O	0,84
MnCl2.4H2O	0,51
Na2MoO4.2H2O	0,25
CuSO4.5H2O	0,12
H3BO3	0,36
Conc. H3PO4	48,0 ml
dH2O	1,0 l

C. Fermentación semicontinua con medio PCOL22 sin kanamicina

25 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

5 Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 2,7 l de medio PCOL22 y se esterilizó. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa 20 g/l, sulfato de magnesio y cloruro cálcico. No se añadió kanamicina. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH se controló a 6,8 mediante la adición de NH_4OH 5 N.

10 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

D. Fermentación semicontinua con medio PCOL22-L

15 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

20 Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 2,7 l de medio PCOL22 -L y se esterilizó. Este medio contiene ácido cítrico y tiene un tercio menos de sales para evitar la precipitación. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH se controló a 6,8 mediante adición de NH_4OH 5 N.

25 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) sin sulfato de magnesio en el fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 gramos de glucosa/litro de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

E. Fermentación semicontinua con medio PCOL12-L

30 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraces de 500 ml graduados con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con agitación ajustada a 250 rpm.

35 Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 2,7 l de medio PCOL22-L y se esterilizó. Este medio contiene un cuarto menos de sales para evitar la precipitación. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH se controló a 6,8 mediante adición de NH_4OH 5 N.

40 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) sin sulfato de magnesio en el fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EET.

45 F. Fermentación semicontinua con medio PCOL12-R

Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con agitación ajustada a 250 rpm.

50 Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 2,7 l de medio PCOL22-R y se esterilizó. Este medio contiene niveles aumentados de extracto de levadura y glucosa para aumentar el crecimiento de la cepa huésped antes de iniciar el suministro de glucosa. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa a 40 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16

55

horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación.

5 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

G. Fermentación semicontinua en recipiente de 20 l.

10 En un procedimiento semi continuo alternativo, se preparó un recipiente de siembra de primera etapa (6 l) con 3,0 l de medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el vehículo con 3,0 ml de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 32 °C.

15 Se preparó un recipiente de fermentación de 20 l con 10,8 l de medio PCOL22 y se esterilizó. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa a 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó del cultivo de recipiente de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH de cultivo se controló a 6,8 a través de la adición de hidróxido de amonio 5 N.

20 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

H. Fermentación semicontinua con siembra de etapa 2

25 Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

30 Se preparó un recipiente de siembra de segunda etapa (6 l) con 3,0 l de medio ZSM complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el recipiente con 100 ml de material de un matraz de siembra de primera etapa que contenía la cepa de producción EE410 (*E. coli* W3110 que contenía el vector de expresión pTAP337). La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 32 °C.

35 Se preparó un recipiente de fermentación de 20 l con 10,8 l de medio PCOL22 y se esterilizó. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa a 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un recipiente de siembra de segunda etapa que se había cultivado durante 12 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue de 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH del cultivo se controló a 6,8 a través de la adición de hidróxido de amonio 5 N.

40 Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

I. Fermentación semicontinua con zGOLD1

45 La construcción del vector de expresión zGOLD1 se describe en el Ejemplo 19. Se preparó un matraz de siembra de primera etapa (matraz de 500 ml graduado con 100 ml de medio) con medio ZSM, complementado con glucosa a 20 g/l y kanamicina a 25 µg/ml. El crecimiento se inició inoculando el matraz con 300 µl de material de un recipiente congelado descongelado que contenía la cepa de producción de *E. coli* W3110 ompT - (zGOLD1) que contenía el vector de expresión pSDH170 o pSDH174. El matraz de agitación se incubó a 32 °C con la agitación ajustada a 250 rpm.

50 Se preparó un recipiente de fermentación de 6 l con 2,7 l de medio PCOL22 y se esterilizó. Después de enfriar el medio de crecimiento se complementó con glucosa a 20 g/l, sulfato de magnesio, cloruro cálcico y kanamicina a 25 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 6,8 con hidróxido de amonio 5 N. La aireación se ajustó a 1 vvm, la agitación se ajustó a 350 rpm y la temperatura a 37 °C. El fermentador se inoculó de un cultivo de matraz de siembra de primera etapa de EE410 que había crecido durante 16 horas a una DO_{600} nm de 16. La inoculación fue del 5 % v/v y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando la velocidad de agitación. El pH del

55

ES 2 371 219 T3

cultivo se controló a 6,8 a través de la adición de hidróxido de amonio 5 N.

Se suministró una solución de glucosa (60 % p/v) al fermentador comenzando a las 8 horas EFT. Se mantuvo una tasa de suministro constante de 9,5 g de glucosa/l de volumen de partida por hora a lo largo de la fermentación. A las 24 horas EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 0,5 mM. La fermentación se recogió a las 48 horas EFT.

5

Medio de Producción de PCOL22

Tabla 5

Ingrediente	Can. g/l o ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,0
KH ₂ PO ₄	2,0
K ₂ HPO ₄	16,5
Antiespumante AF208	0,1 ml
Agua DI	0,920 l
extracto de levadura (opcional)	5,0
Después de esterilizar con autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1M	10 ml
Solución Trace D*	34,0 ml
Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1M	2 ml
Glucosa (60 % p/v)	33,0 ml

Medio PCOL22-L

Tabla 6

Ingrediente	Can. g/l o ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,25
KH ₂ PO ₄	1,32
K ₂ BPO ₄	10,90
Ácido Cítrico	1,0 g
Antiespumante AF204	0.1 ml
Agua DI	0,920 l
Después de esterilizar con autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1M	10 ml
Solución Trace D*	34,0 ml

10

ES 2 371 219 T3

(cont)

Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1 ml
CaCl ₂ -2H ₂ O 1M	2 ml
Glucosa (60 % p/v)	33,0 ml

60 % de glucosa para semicontinua usando medio PCOL22-L y PCOL 12L

Tabla 7

Ingrediente	Can g/l
H ₂ O	800 ml
Glucosa (60 % p/v)	1.200 g
Ajustar volumen con H ₂ O a:	2,0 l
Autoclave	

5

Medio PCOL12-R

Tabla 8

Ingrediente	Can. g/l o ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,0
KH ₂ PO ₄	2,0
K ₂ BPO ₄	16,5
Extracto de Levadura	20,0
Antiespumante AF204	0,1 ml
Agua DI	0,920 l
Después de esterilizar con autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1M	10,0 ml
Solución Trace D*	34, 0 ml
Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1 ml
CaCl ₂ -2H ₂ O 1M	2 ml
Glucosa (60 % p/v)	66,0 ml

Medio PCOL12-L

Tabla 9

Ingrediente	Can. g/l o ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,5
KH ₂ PO ₄	1,50
K ₂ HPO ₄	12,4
Extracto de Levadura	5,0
Antiespumante AF204	0,1 ml
Agua DI	0,920 l
Después de esterilizar con autoclave añadir:	
MgSO ₄ 1M	10,0 ml
Solución Trace D*	34,0 ml
Kanamicina (concentración de reserva 25 mg/ml)	1 ml
CaCl ₂ -2H ₂ O 1M	2 ml
Glucosa (60 % p/v)	33,0 ml

Ejemplo 9

Recuperación de FGF18

5 A. Rotura de células recogidas

El sedimento de *E. coli* recogido se produjo por fermentación semicontinua y contenía aproximadamente 5-6 g/l de FGF 18 o trFGF18 en forma de cuerpos de inclusión. El caldo de fermentación (1 l) se sedimentó por centrifugación a 8.000 x g durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en 850 ml de tampón de rotura (Tris 100 mM, pH 7,2, ZnCl₂ 5 mM) y se enfrió en hielo. El caldo se pasó a través del homogeneizador APV tres veces a 68,93 MPa. El caldo se centrifugó después a 8.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. El sedimento se lavó dos veces por resuspensión en 800 ml de agua DI y se centrifugación a 8.000 x g durante 40 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. El sedimento de cuerpos de inclusión se almacenó a -60 °C o se replegó sin congelar.

B. Rotura Directa del caldo recogido

15 El caldo de *E. coli* recogido se produjo por fermentación semicontinua y contenía aproximadamente 6-7 g/l de FGF18 o trFGF18 en forma de cuerpos de inclusión. El caldo de fermentación (0,5 l) se diluyó a 1,0 l con agua desionizada y se pasó a través del homogeneizador APV tres veces a 68,93 MPa. El caldo se centrifugó después a 15.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. El sedimento se resuspendió en 500 ml de agua DI y se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. La etapa de lavado se repitió y el sedimento de cuerpos de inclusión se almacenó a -80 °C o se replegó sin congelar.

C. Solubilización y precipitación

25 1. Se consiguió solubilización por suspensión del sedimento del cuerpo de inclusión lavado en 200 ml de Tris 100 mM, clorhidrato de Guanidina 6 M, ZnCl₂ 5 mM, pH 7,2 a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se centrifugó después a 12.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se mantuvo a 4 °C. El sobrenadante se diluyó 1:8 (v/v) en Tris 100 mM, ZnCl₂ 5 mM, pH 7,2. La suspensión se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó. El sedimento se resuspendió en 200 ml de Tris 100 mM, urea 8 M, pH 7,2. La suspensión se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó. El procedimiento de lavado se repitió dos veces más. La resolubilización se consiguió por suspensión del

sedimento lavado en 200 ml de Tris 100 mM, clorhidrato de Guanidina 6 M, DTT 10 mM, pH 7,2. La suspensión se centrifugó a 12.000 x g durante 30 minutos. La concentración de proteínas en el sobrenadante como se midió por ensayo de proteínas HPLC fue de 10 mg/ml. La muestra de FGF 18 o trFGF18 se almacenó después a 4 °C.

- 5 2. La solubilización de FGF18 o trFGF18 se consiguió suspendiendo el sedimento de cuerpos de inclusión lavado en clorhidrato de guanidina 6 M, ditioneitol (DTT) 40 mM preparado en Tris 100 mM, pH 8,0 (GDT40). Se usaron aproximadamente 150 ml de GDT40 por litro de caldo de fermentación original. La solubilización tuvo lugar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se centrifugó la suspensión. El sobrenadante de los cuerpos de inclusión disueltos se replegó por dilución (20-30 X) en un tampón de replegamiento que contenía un par de oxidación-reducción cistina/DTT más arginina 0,75 M. Se permitió que el replegamiento tuviera lugar durante 5-16 horas después de lo cual el pH de la mezcla se ajustó a pH 5,5 y se filtró antes del suministro para purificación.

D. Rotura directa de caldo recogido de zGOLD1

- 15 El caldo zGOLD1 de *E. coli* recogido se produjo por fermentación semicontinua en medio PCOL22 (descrito anteriormente) y contenía aproximadamente 9-10 g/l de trFGF18 en forma de cuerpos de inclusión. El caldo de fermentación (0,5 l) se diluyó a 1,0 l con agua desionizada y se pasó a través del homogeneizador APV tres veces a 68,93 MPa. El caldo se centrifugó después a 15.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. El sedimento se resuspendió en 500 ml de agua DI y se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, teniendo cuidado de conservar el sedimento suelto. El sedimento de cuerpos de inclusión se almacenó a -80 °C o se replegó sin congelar.

Ejemplo 10

A. Solubilización de cuerpos de inclusión lavados

- 25 Se consiguió solubilización por suspensión del sedimento del cuerpo de inclusión lavado en 150 ml de Tris 100 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, ditioneitol 20 mM, pH 7,5 a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se centrifugó después a 12.000 x g durante 30 minutos. La concentración de proteína en el sobrenadante como se midió por ensayo de proteínas HPLC fue de 21 mg/ml. La muestra de FGF18 se almacenó después a 4 °C.

B. Solubilización de cuerpos de Inclusión Lavados de zGOLD1

- 30 Se consiguió solubilización por suspensión de un sedimento de cuerpos de inclusión lavado de 1 l de caldo de fermentación en 150 ml de Tris 100 mM, clorhidrato de Guanidina 6 M, ditioneitol 40 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se centrifugó después a 15.000 x g durante 30 minutos. La concentración de proteína en el sobrenadante como se midió por ensayo de proteínas HPLC fue de 2,9 mg/ml. La muestra se almacenó después a 4 °C.

C. Clarificación de cuerpos de inclusión solubilizados

- 35 Se usó resina de cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) para clarificar sedimentos de cuerpos de inclusión de FGF18 solubilizados. En un ejemplo, los sedimentos de cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron durante 1 hora a temperatura ambiente en HCl de guanidina 6 M, que contenía Imidazol 10 mM, pH 7,5, se cargaron columnas de trampa de His de 1,0 ml (Amersham Biosciences) con 0,5 ml de NiSO₄ 0,1M. Después de cargar y lavar con agua, se usaron 5,0 ml de tampón de unión que consistía en GuHCl 6 M, Imidazol 20 mM, NaCl 0,5 M y fosfato 20 mM para equilibrar la columna.

- 40 La muestra de soluto (1,0 ml) se aplicó a la columna y la columna se lavó con 5,0 ml del tampón de unión. Se eluyó FGF18 aplicando 2,5 ml de tampón de elución (GuHCl 6M, Imidazol 0,5 M, NaCl 0,5 M y fosfato 20 mM) a la columna. La etapa de elución y las muestras se analizaron con respecto a pureza y clarificación usando geles de SDS-PAGE.

Ejemplo 11

Replegamiento

A. Renaturalización

- 50 Se determinó por HPLC de fase inversa que la concentración de FGF18 en la fracción solubilizada era 21 mg/ml. La determinación del volumen de tampón de replegamiento se basó en la cantidad de soluto y la concentración a FGF18 presente en el soluto. El tampón de replegamiento (Tris 50 mM pH 8 y NaCl 120 mM) se añadió seguido de CuSO₄ 0,5 M (1:1.000 v/v) y se agitó durante 30 minutos.

Ejemplo 12

Captura de FGF18 replegada

A. Intercambio catiónico usando resina TOYOPEARL SP 550 C

Después de la concentración, se capturó FGF18 en una columna de intercambio catiónico. En un ejemplo, la FGF18 concentrada se diluye tres veces con agua o acetato sódico 25 mM, pH 5,5. Se forma un precipitado que se retira por filtración después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se usa un filtro Polysep II de 1,2 µm de Millipore (Millipore) o una membrana Cuno Zeta Plus A30MO3 de 1,2-0,8 µm (Cuno, Meriden, CN). La FGF18 filtrada se carga en una columna de resina TOYOPEARL_SP550C (Tosoh Biosep) equilibrada con tampón de equilibrio (acetato sódico 25 mM, NaCl 0,2 M, pH 5,5). La columna se carga a una capacidad de 6-10 g de FGF18 por litro de resina, la altura del lecho es de 15 cm, la absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm se controla y se usa un caudal de 150 cm/hora. Después de cargar la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de UV vuelve a la medida basal. La columna se lava después con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 50 %, tampón de elución 50 % (acetato sódico 25 mM, NaCl 1,0 M, pH 5,5). Se eluye FGF18 de la columna con tampón de equilibrio 25 %, tampón de elución 75 %. Como alternativa, después de cargar FGF18 en la columna y lavar con tampón de equilibrio, se eluye FGF18 de la columna con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 100 % a tampón de elución 100 %.

Como alternativa, después del ajuste de pH, dilución, etapa de mantenimiento y filtración usando filtración de profundidad, la FGF18 se captura en cromatografía de intercambio catiónico. La solución filtrada se carga en una columna de resina TOYOPEARL_SP550C (Tosoh Biosep) y se equilibra a condiciones de tampón de equilibrio (acetato sódico 25 mM, pH 5,5, NaCl 0,4 M). La columna se carga a una capacidad de 6 a 15 g de FGF18 por litro de resina. La absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm se controla y se usa un caudal de 150 cm/hora. Después de la carga, la columna se carga con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de UV vuelve a la línea basal. Se eluye FGF18 de la columna usando un gradiente de etapa para tampón de elución 100 % (acetato sódico 25 mM, pH 5,5, NaCl 0,75 M).

B. Cromatografía de intercambio catiónico usando resina de SP Sepharose XL

La FGF18 concentrada se diluye 10 veces con acetato sódico 25 mM, pH 5,5. Se forma un precipitado que se retira por filtración después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se sigue un filtro Polypro XL de 1,2 µm de Millipore (Millipore) de un filtro Whatman Polycap 75 AS de 0,45 µm (Maidstone, Kent, Reino Unido). La FGF18 filtrada se carga en una columna de resina de SP Sepharose XL de Amersham Biosciences equilibrada con tampón de equilibrio (acetato sódico 25 mM, NaCl 0,2 M, pH 5,5). La columna se carga a una capacidad de 3-6 g de FGF18 por litro de resina, la altura del lecho es de 15 cm, la absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm se controla y se usa un caudal de 150 cm/hora. Después de cargar la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de UV vuelve a la medida basal. La columna se lava después con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 25 %, tampón de elución 75 % (acetato sódico 25 mM, NaCl 1,0 M, pH 5,5). Se eluye FGF18 de la columna con tampón de equilibrio 50 %, tampón de elución 50 %.

C. Cromatografía de intercambio catiónico usando resina Streamline SP XL

En otro ejemplo, FGF18 no se concentra por filtración de flujo tangencial antes de la captura por cromatografía de intercambio catiónico. Después del replegamiento, el pH se ajusta a 5,5 y el material se filtra a través de un filtro de punto de corte nominal de 1,2 µm. Se equilibra una columna Streamline de Amersham Biosciences empaquetada con Streamline SP XL de Amersham Biosciences con tampón de equilibrio (acetato sódico 25 mM, NaCl 0,2 M, pH 5,5). Después del equilibrio, la FGF18 replegada filtrada con pH ajustado se carga en la columna usando dilución en línea, es decir, se carga FGF18 replegada ajustada para el pH filtrada al 30 % y agua al 70 % usando el sistema de cromatografía para generar la relación correcta. La FGF18 se carga en la columna en una dirección de flujo ascendente usando un caudal que provoca una expansión dos veces de la resina en comparación con la altura del lecho sedimentado. Una vez que la FGF18 replegada ajustada para pH filtrada se ha cargado se reemplaza con tampón de equilibrio. El bombeo a la columna se continúa después con tampón de equilibrio al 30 % y agua al 70 % hasta que la conductividad registrada en la entrada de columna es < 10 mS/cm. La columna se lava después con tampón de equilibrio en modo de flujo ascendente con una expansión de altura de lecho sedimentado dos veces hasta que la absorbancia de UV a 280 nm vuelve a la medida basal. El flujo se detiene después y se permite que el lecho de la resina se sedimente. Se desciende el émbolo de la columna de Streamline a la altura del lecho sedimentado y la columna se lava con tampón de equilibrio en modo de flujo descendente para 2 volúmenes de columna a un caudal de 150 cm/hora. Después se eluye FGF18 con tampón de elución 50 % (acetato sódico 25 mM, NaCl 1,0 M, pH 5,5) y tampón de equilibrio 50 % en modo de flujo descendente a 150 cm/hora.

Ejemplo 13

Purificación intermedia de FGF18 por cromatografía de interacción hidrófoba

A. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando resina de Sepharose de butilo

Se ajusta FGF18 a sulfato de amonio 1,5 M añadiendo 198 g de sulfato de amonio sólido por litro de solución de FGF18. La solución se agita hasta que el sulfato de amonio se disuelve y después se retira material sólido por filtración a través de un filtro de punto de corte nominal de 0,45 µm. En un ejemplo, se equilibra una columna de 15 cm alto de butil Sepharose 4 FF de Amersham Biosciences para tampón de equilibrio (acetato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 5,5). La solución de FGF18 filtrada ajustada se carga en la columna a una capacidad de 1,0-2,5 g de FGF18 por l de resina a un caudal de 150 cm/hora. Se controla la absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm. Después de cargar la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de UV vuelve a la medida basal. FGF18 se eluye de la columna con tampón de equilibrio 50 % y tampón de elución 50 % (acetato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 5,5). Como alternativa, después de cargar FGF18 en la columna y lavar con tampón de equilibrio, FGF18 se eluye de la columna con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 100 % a tampón de elución 100 %.

B. HIC usando resina TOYOPEARL 650 M

En otro ejemplo se usa una resina diferente, butilo de TOYOPEARL 650 M de Tosoh Biosep para purificar la FGF18. El procedimiento es el mismo que el usado para la resina de butil Sepharose FF con las siguientes excepciones: el eluato de intercambio catiónico se ajusta a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M usando una solución madre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 M; la solución de FGF18 filtrada ajustada se carga en la columna a una capacidad de 10-12 g de FGF18 por l de resina; después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de UV vuelve a la medida basal; FGF18 se eluye de la columna con tampón de elución 100 % (acetato sódico 25 mM, pH 5,5, NaCl 0,05 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M).

Ejemplo 14

A. Concentración e intercambio de tampón de FGF18 purificado a solución salina tamponada con fosfato

Después de la purificación FGF18 se somete a ultrafiltración y diafiltración para concentrarlo e intercambiarlo a un tampón adecuado para almacenamiento. Se sanea un aparato de filtración de flujo tangencial y membranas (placa de punto de corte de 5 kDa de peso molecular y sistema de marco de Millipore Pellicon Biomax) usando NaOH 0,5 M y se aclaran con agua. Para FGF18 purificada de 1 l de caldo de fermentación, se usa un área de membrana de 0,1 m² o menor con una tasa de flujo cruzado de aproximadamente 20-25 litros/hora y una presión transmembrana de 68,95 kPa a 103,42 kPa. FGF18 se concentra a aproximadamente 15-20 mg/ml y después se diafiltra frente a aproximadamente 5-10 diavolúmenes de solución salina tamponada con fosfato, pH 6,0. La FGF18 con intercambio de tampón concentrada se almacena a -80 °C.

B. Concentración e intercambio de tampón de FGF18 purificada a tampón de histidina/manitol

Después de la purificación por SP HP Sepharose, FGF18 se somete a ultrafiltración y diafiltración para concentrar e intercambiar FGF18 purificada a un tampón adecuado para almacenamiento. Se sanean un aparato de filtración de flujo tangencial y membranas (placa de punto de corte de 5 kDa de peso molecular y sistema de marco Millipore Pellicon Biomax) usando NaOH 0,5 M y se aclaran con agua. Para FGF18 purificada, de 1 l de caldo de fermentación, se usa un área de membrana de 0,1 m² o menos con una tasa de flujo cruzado de aproximadamente 30 l/hora a una presión transmembrana de 172,37. FGF18 se concentra a aproximadamente 10-15 mg/ml y después se diafiltra frente a aproximadamente 5-10 diavolúmenes de histidina 10 mM, manitol 4,72 % (p/v), pH 5,0-5,3. La solución resultante se esteriliza por filtración.

Ejemplo 15

Purificación adicional de FGF18

A. Cromatografía de intercambio catiónico usando resina de SP HP Sepharose para pulido

Se realiza purificación adicional usando SP HP Sepharose para mejorar adicionalmente la pureza global. El eluato de butilo de TOYOPEARL 650 M se eluye a 30 mS/cm con agua y después se ajusta a pH 6,0 usando una solución madre de fosfato sódico dibásico. La solución ajustada se filtra después usando un filtro de 0,22 µm. El material filtrado se carga en la columna a 10-15 g de FGF18 por l de resina en una columna equilibrada con fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 0,3 M. Se usan UV 280 nm y UV 215 nm para controlar la cromatografía. Después de cargar, la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que UV alcanza la medida basal. Se eluye FGF18 de la columna usando un gradiente de 20 volúmenes de columna a tampón de elución 100 % (fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 0,7 M).

B. Cromatografía de intercambio aniónico

FGF18 se pasa a través de una columna de intercambio aniónico para retirar endotoxina. Se equilibra una columna de Q Sepharose FF de Amersham Biosciences con tampón de equilibrio (Tris 20 mM, pH 8,0). La solución de FGF18 se ajusta a una conductividad de < 10 mS/cm con tampón de equilibrio. La solución de FGF18 ajustada se carga en la columna a un caudal de 150 cm/hora. FGF18 no se une a la columna y se recoge en el flujo continuo. En otros ejemplos, puede usarse resina DEAE Sepharose FF de Amersham Biosciences o membranas Q Pall Mustang en lugar de Q Sepharose FF para purificar FGF18. En otros ejemplos más, se ha mostrado que los valores de pH en el

intervalo de 5,0 a 9,0 dan como resultado FGF18 que pasa a través del medio de intercambio aniónico.

C. Cromatografía de interacción hidrófoba

5 En otros ejemplos, se ha usado cromatografía de interacción hidrófoba, usando condiciones diferentes de las descritas anteriormente con resina de butilo para purificar FGF18. Puede usarse fenil Sepharose FF de alto Sub de Amersham Biosciences, fenil Sepharose HP de Amersham Biosciences y butil Sepharose 4 FF de Amersham Biosciences como resina en modos tanto de unión como de flujo continuo. Para unir FGF18, las columnas se equilibran con acetato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 5,5. FGF18 se ajusta a sulfato de amonio 1,5 M añadiendo sulfato de amonio sólido y agitando hasta que se disuelve. La solución de FGF18 ajustada se carga en la columna equilibrada a un caudal de 150 cm/hora. Se controla la absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm. Después del lavado, la FGF18 se eluye de la columna con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 100 % a tampón de elución 100 % (acetato sódico 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5). En modo de flujo continuo la solución que contiene FGF18 se ajusta a sulfato de amonio 1,0 M o menos y se carga en una columna equilibrada con acetato sódico 25 mM, NaCl 50 mM, sulfato de amonio 1,0 M, pH 5,5. Se recoge el flujo continuo.

15 En otros ejemplos, se ha usado cromatografía de interacción hidrófoba usando sulfato sódico como sal, en lugar de sulfato de amonio, para purificar FGF18. Puede usarse fenil Sepharose FF de alto Sub de Amersham Biosciences, fenil Sepharose HP de Amersham Biosciences y butil Sepharose 4 FF de Amersham Biosciences como resina. Las columnas se equilibran a acetato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, sulfato sódico 1,5 M, pH 5,5. FGF18 se ajusta a sulfato sódico 1,5 M añadiendo sulfato sódico sólido y agitando hasta que el sulfato sódico se disuelva. La solución de FGF18 ajustada se carga en la columna equilibrada a un caudal de 150 cm/hora. Se controla la absorbancia de UV a 280 nm y 215 nm. Después del lavado, la FGF18 se eluye de la columna con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio 100 % a tampón de elución 100 % (acetato sódico 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5).

25 En otro ejemplo, se realizó flujo continuo de HIC FPLC en un sistema BIOCAD 700E FPLC (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) equipado con columna de butil Sepharose 4 FF (Amersham Biosciences). La columna se acondicionó con NaOAc 25 mM, NaCl 600 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M, pH 5,5. Se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido al eluato de intercambio catiónico a una concentración final de 1 M. La solución se cargó en la columna y se recogió FGF18 en el flujo continuo.

D. IMAC usando Sepharose quelante metálico

30 Se usa Sepharose quelante de Amersham Biosciences (Amersham) para purificar adicionalmente FGF18. Se carga eluato de FGF18 CIE capturado en una columna cargada con cobre, zinc o iones de níquel equilibrada después con acetato sódico 25 mM, pH 5,5; NaCl 0,8 M. Se usan UV 280 nm y UV 215 nm para controlar la cromatografía. La columna se lava después con tampón de equilibrio hasta la medida basal y se eluye usando un gradiente de 10 VC a tampón de elución 100 % (acetato sódico 25 mM, pH 5,5; NaCl 0,8 M, imidazol 0,5 M).

35 Ejemplo 16

A. Análisis de HPLC de fase inversa de FGF18 solubilizada en tampón de acetonitrilo

40 El procedimiento descrito en el presente documento se usa para cuantificar FGF18 en muestras de cuerpos de inclusión solubilizados y muestras purificadas. Se usa una columna Jupiter C5 de 4,6 x 50 mm (300 Å, 5 µm, Phenomenex) en un sistema de HPLC de serie 1100 de Agilent Technologies con automuestreo con termostato y compartimento de columna con termostato. Se coloca un filtro de pre-columna de 0,2 µm antes de la columna. La fase móvil A es TFA 0,1 % en agua de uso en HPLC y la fase móvil B es TFA 0,1 % en acetonitrilo.

La tabla de gradiente de elución/tiempo para muestras purificadas es como sigue:

Tabla 10

Tiempo	%B
0	5
3,5	5
4	41
14	48
14,5	95
17	95
17,5	4
20	5

ES 2 371 219 T3

La tabla de gradiente de elución/tiempo para muestras de cuerpo de inclusión solubilizadas es:

Tabla 11

Tiempo	%B
0	5
4,0	5
5,5	40
20,0	50
21,0	95
22,0	95
23,0	5
30,0	5

5 La columna se equilibra a las condiciones iniciales de la tabla de gradiente de elución/tiempo hasta que se consiga una medida basal estable.

Los parámetros del procedimiento son como sigue:

1. Caudal: 1 ml/min.
2. Tiempo de ejecución total: 20 minutos
3. Temperatura de columna: 40 °C
- 10 4. Temperatura de automuestreo: 8 °C
5. Presión de columna máxima: 24 MPa
6. Velocidad de extracción del inyector: 100 µl/minuto
7. Velocidad de eyección del inyector: 100 µl/minuto
- 15 8. Longitud de onda de recogida de datos del detector de serie de diodos: señal A: 280 nm, ancho de banda 25 nm
9. Longitud de onda de control de datos del detector de serie de diodos: señal B: 215 nm, ancho de banda 10 nm
10. Longitud de onda de referencia de datos del detector de serie de diodos: señal A: 350 nm, ancho de banda 25 nm; señal B: 350 nm, ancho de banda 25 nm
- 20 11. Autoequilibrio del detector de serie de diodos: modo pre-ejecución/post-ejecución
12. Tiempo de respuesta a anchura máxima: > 0,1 min.
13. Anchura de rendija: 4 nm
14. Función de lavado de aguja: programada para reducir la acumulación de guanidina en la aguja y asiento de agujas.

25 Para la cuantificación de FGF18 no plegada, se diluye patrón de referencia de FGF18 a 0,5 mg/ml con Tris 50 mM, pH 7,5, guanidina HCl 6 M, DTT 10 mM y se calienta a 40 °C durante 20 minutos. Se inyecta patrón de referencia diluido en la columna a al menos cinco niveles entre 10 µg y 50 µg (por ejemplo, inyecciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg). Las muestras de FGF18 solubilizadas se centrifugan en una microcentrífuga y se diluyen 1:10 en Tris 50 mM, pH 7,5, guanidina HCl 6 M antes de inyección de 25 µl de muestra.

30 Para la cuantificación de FGF18 plegada, se diluye patrón de referencia de FGF18 a 1,0 mg/ml con solución salina tamponada con fosfato, pH 6,0. Se inyectan muestras de FGF18 plegada a la HPLC sin ningún tratamiento. Después de la cromatografía el área bajo los picos de FGF18 se integra. Se construye una curva patrón y se lee la concentración de FGF18 en las muestras a partir de la curva patrón.

B. RP-HPLC basado en metanol para cuantificación de FGF18

35 También puede usarse un procedimiento de RP-HPLC basado en metanol de quince minutos para evaluar preparaciones de FGF18 que varían de cuerpos de inclusión solubilizados al producto final.

Los parámetros del procedimiento para análisis de RP-HPLC basado en metanol de FGF18 son como sigue:

Columna: Zorbax 300SB-CN (4,6 x 50 mm), 3,5 micrómetros

Fase móvil A: TFA 0,154 %, agua de uso en HPLC

40 Fase móvil B: TFA 0,154 %, metanol

Tabla de gradiente de elución/tiempo

Tabla 12

Tiempo	%B	Caudal (ml/minuto)
0	50	1,0
1,0	50	1,0
11,0	100	1,0
12,0	100	1,0
12,5	50	1,5
15,0	50	1,5

Tiempo de ejecución total: 15 minutos

Temperatura de columna: 40 °C

5 Temperatura de automuestreo: 5 °C

Velocidad de extracción del inyector: 90 µl/minuto

Velocidad de eyección del inyector: 90 µl/minuto

Longitud de onda de control de DAD: Señal A: 280 nm, ancho de banda 8 nm

Señal B: 215 nm, ancho de banda 8 nm

10 Señal C: 280 nm, ancho de banda 6 nm (longitud de onda de referencia desactivada)

Longitud de onda de recogida de datos de DAD: Señal A: 280 nm, ancho de banda 8 nm

Longitudes de onda de referencia de DAD: Señales A y B, 360 nm, ancho de banda 16 nm

Autoequilibrio de DAD: Modo de pre-ejecución/post-ejecución

15 Tiempo de respuesta en anchura máximo: > 0.1 minutos.

Anchura de rendija: 4 nm

Margen para absorbancia negativa: 100 mAu

Intervalo de cantidad de carga de la curva patrón: 1-20 µg

Volumen de inyección mínimo: 5 µl

20 Volumen de inyección máximo: 100 µl

Límite de presión: 35 MPa

Presión de ejecución normal: 13-20 MPa

Ejemplo 17

Cepa deficiente en OmpT para expresar FGF18

25 A. Construcción de una nueva cepa huésped para producción de genes heterólogos

El actual procedimiento de producción de FGF18 incluye expresión en el huésped *E.coli* W3110 [F-mcrA mcrB IN (rrnD-rrnE) 1 λ-]. Aunque W3110 es un huésped robusto, no es ideal para su procesamiento corriente arriba. Tras la lisis celular, FGF18 se escinde en el aminoácido 196 (Lys) (como se muestra en SEC ID N°: 6) por la proteasa OmpT presente en la membrana exterior. Se sabe que esta proteasa escinde otras proteínas recombinantes heterólogas, incluyendo FGF18. La proteólisis de FGF18 no se produce en cepas que carecen de OmpT, tales como BL21 [F-ompT hsdSB (rB - mB-) gal dcm lon]. Aunque la actividad de OmpT puede minimizarse durante la lisis celular con la adición de ZnSO₄ o CuSO₄, el esquema de purificación tuvo que diseñarse para retirar FGF18 troncada del producto final. En un esfuerzo para racionalizar el procedimiento para producción de FGF18 y otros genes heterólogos, la proteasa OmpT se retiró de W3110 para crear una nueva cepa de producción. La construcción de esta nueva cepa huésped de *E.coli* se describe posteriormente.

B. Construcción de plásmido pCHAN1 para expresión en el operón de recombinasa Red

Se usó una estrategia basada en recombinación homóloga para retirar la proteasa OmpT de W3110. Para eliminar genes eficazmente del cromosoma de *E.coli* por recombinación homóloga, deben estar presentes ciertas enzimas con actividad recombinasa dentro de las células. Para conseguir esto, se construyó un plásmido que portaba el operón de recombinasa Red del bacteriófago λ. Se sintetizó un fragmento que contenía los genes de recombinasa Red de ADN de bacteriófago λ (New England Biolab) por PCR usando cebadores específicos de recombinación ZC43.586 (SEC ID N°: 23) y ZC43.587 (SEC ID N°: 24). La reacción contenía 100 pmol de cada uno de los cebadores ZC43.586 y ZC43.587, 10 µl de tampón de PCR 10X (Boehringer Mannheim), 1 µl de polimerasa Pwo (Boehringer Mannheim) 10 µl de mezcla de nucleótido trifosfato 0,25 mM y dH₂O en un volumen final de 100 µl (Perkin Elmer). La reacción de PCR consistía en un ciclo sencillo de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1

minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72 °C . El último de los 30 ciclos se siguió de una extensión de 5 minutos a 72 °C y la reacción concluyó con un mantenimiento durante una noche a 4 °C. El fragmento de 1964 pares de bases (pb) resultante contenía el operón de recombinasa Red (SEC ID N°: 25). La secuencia de nucleótidos como se muestra en SEC ID N°: 25 codifica tres genes, *Gam*(γ) como se muestra a partir de los nucleótidos 41-454, *Bet*(β) como se muestra a partir de los nucleótidos 463-1245 y *Exo* como se muestra a partir de los nucleótidos 1245-1922.

El operón de recombinasa Red se incorporó a un plásmido por recombinación homóloga en levadura. Se combinaron células de levadura competentes (100 μ l de *S. cerevisiae* SF838-9D α) con 100 ng de pTAP399 digerido con SmaI (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Manassas, VA. (PA-4853), un vector de expresión para la producción de IL-21), vector aceptor y 1 μ g del fragmento de PCR anterior. La mezcla de levadura/ADN se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm y se aplicaron pulsos a 0,75 kV (5 kV/cm), Ω infinita, capacitador 25 μ F. La mezcla de transformación se añadió después a 1 ml de sorbitol 1,2 M y se incubó a 30 °C durante 1 hora. Las células se sembraron en alícuotas de 500 μ l en dos placas URA DS (dextrosa 2 %, sorbitol 2 %) y se incubaron a 30 °C durante 2 días. Después de aproximadamente 48 horas los transformantes de levadura Ura⁺ de las placas se suspendieron en 2 ml de H₂O y se sedimentaron por centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis Qiagen P1 (Qiagen) y se transfirió a un tubo fresco que contenía 1 ml de perlas de zircona/sílice de 0,5 mm (Biospec Products Inc.). Las células se lisaron, se permitió que las muestras se sedimentaran, se transfirieron 250 μ l de lisado a un tubo fresco y se aisló el ADN plasmídico usando el kit de Miniprep Qiagen Spin de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se transformaron células electrocompetentes *E. coli* DH10B (Invitrogen) con 1 μ l del prep. de ADN de levadura. Se sometió a pulsos a las células en cubetas de 0,1 cm a 2,0 kV, 25 μ F y 100 Ω . Después de la electroporación, se añadieron 250 μ l de SOC (Bacto triptona 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a cada muestra. Se permitió que las células se recuperaran a 37 °C durante 2 horas. La muestra de 250 μ l completa se sembró en una alícuota en una placa LB (caldo LB (Lennox), Bacto Agar 1,8 % (Difco)) que contenía kanamicina 25 mg/l (Sigma). Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche. Los clones individuales que albergaban el operón de recombinasa Red se identificaron por digestión de restricción para verificar la presencia del inserto. Los insertos de clones positivos se sometieron a análisis de secuencia. Un plásmido que contenía el inserto correcto se designó pCHAN1.

La secuencia de levadura se retiró después de la cadena principal del vector de pCHAN1. Se incubaron durante una noche 3,0 μ l de ADN plasmídico con 24,3 μ l de H₂O, 2,7 μ l de tampón H (Roche) y 2,0 μ l de NotI (New England Biolabs) a 37 °C. Se mezclaron 5 μ l de la digestión de una noche con 1 μ l de colorante de muestra de ADN 6X (Ficoll tipo 400 25 % (Sigma), azul de bromofenol 0,25 % (EM Science), Cianol de xileno 0,25 % (Kodak Biomedicals Inc)), y se aplicaron 4 μ l de esta solución en un gel de agarosa 1 % (EM Science) para verificar la digestión completa. Para recircularizar el plásmido, se mezclaron 14 μ l de la digestión de NotI de una noche con 4 μ l de tampón de ligación 5x (Invitrogen) y 2 μ l de ligasa (Invitrogen). La ligación se incubó durante una noche a 25 °C.

El pCHAN1 religado se transformó en W3110. Las células W3110 electrocompetentes (50 μ l) se transformaron con 1 μ l de ADN de pCHAN1 usando el protocolo de electroporación para *E. coli* descrito anteriormente. Después de la recuperación, se sembró la mezcla completa de 250 μ l de transformación en una alícuota en una placa LB que contenía kanamicina 25 mg/l. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y se seleccionaron diez de los clones resultantes para análisis posterior. Se cultivaron a 37 °C durante una noche en 2,0 ml de Superbroth II (Becton Dickinson) que contenía kanamicina 25 μ g/ml. El día siguiente, se usó 1,0 ml de la digestión de una noche para confirmar la presencia de pCHAN1. Se usó el kit de Miniprep Qiagen Spin para preparar ADN plasmídico, siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad del plásmido se confirmó mediante digestión de restricción usando EcoRI (Gibco BRL) y NotI (New England Biolabs). El aislado N° 3 se seleccionó para experimentación posterior y se nombró EE670.

Generación de fragmentos de tetraciclina para reemplazo génico en W3110

El gen de tetraciclina se seleccionó como un marcador adecuado para recombinación homóloga en el locus *OmpT*, haciendo al gen de *OmpT* inactivo. El fragmento de promotor de tetraciclina::tetraciclina (*tet*^P::*tet*) se generó por PCR a partir de ADN de pBR322 (New England Biolabs) usando los cebadores específicos de recombinación ZG45.112 (SEC ID N°: 26) y ZG45.171 (SEC ID N°: 27). La mezcla de reacción contenía 100 pmoles de cada uno de los cebadores ZG45.112 y ZG45.171, 10 μ l del tampón de PCR 10X (Boehringer Mannheim), 1 μ l de polimerasa Pwo (Boehringer Mannheim), 10 μ l de mezcla de nucleótido trifosfato 0,25 mM (Perkin Elmer) y dH₂O en un volumen final de 100 μ l. Las condiciones para la reacción de PCR fueron 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 2 minutos a 72 °C. Esto se siguió de una extensión de 7 minutos a 72 °C y un mantenimiento durante una noche a 4 °C. El fragmento de 1590 pb resultante porta *tet*^P::*tet* (SEC ID N°: 28).

La reacción de PCR se cargó en un gel preparatorio de agarosa 1 % para purificar el fragmento *tet*^P::*tet*. El fragmento *tet*^P::*tet* se cortó del gel y se colocó en un tubo eppendorf de 0,5 ml con un pequeño agujero en el fondo que estaba recubierto con vellón de filtrado de acuario (Finny Products, Inc., Cincinnati, OH). El tubo se insertó en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó en una centrifuga de sobremesa a 14.000 rpm durante 10 minutos a 25 °C.

El líquido en el fondo del tubo de 1,5 ml se mezcló con NaOAc 3 M 10 % (vol/vol) y 2 volúmenes de etanol 100 %. La muestra se incubó a -20 °C durante 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C en una centrifugadora de sobremesa para precipitar el fragmento de PCR. El sobrenadante se aspiró y el sedimento se resuspendió en 50 µl de H₂O. El fragmento de tet^P::tet estaba a una concentración de trabajo de 50 ng/µl.

5 El fragmento de PCR se ligó en el vector pCR4.0-BLUNT TOPO® (Invitrogen) para su uso como un control positivo para los experimentos de reemplazo génico. La ligación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transformaron células de *E. coli* DH10B (Invitrogen) con 2 µl del fragmento de ADN tet^P::tet usando el protocolo de electroporación para *E. coli* descrito anteriormente. Después de la recuperación, se sembró la mezcla de transformación completa de 250 µl en una placa de LB que contenía ampicilina 100 mg/l (Sigma). Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche.

10 Se seleccionaron diez clones para análisis adicional. Se cultivaron en 2,0 ml de Superbroth II (Becton Dickinson) que contenía ampicilina 100 µg/ml a 37 °C. Al día siguiente, se usó 1,0 ml del cultivo de una noche para confirmar la presencia de ADN plasmídico. Se usó el kit de Miniprep Qiagen Spin para preparar ADN plasmídico, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se sometió a análisis de restricción usando Sall (New England Biolabs) y PstI (New England Biolabs) para verificar la identidad del plásmido y la orientación del inserto. El aislado N° 1 se seleccionó para experimentación posterior. El plásmido se nombró pSDH185 y el clon, EE686.

Reemplazo génico en W3110: delección del gen de OmpT

20 Se dejó crecer un cultivo de 500 ml de W3110/pCHAN1 a 37 °C en medio SOB [triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 250 mM 10 ml/l, MgCl₂ 2 M 5 ml/l, pH 7,0] a una DO₆₀₀ de 0,6. El cultivo se separó en cuatro cultivos de 125 ml. Se dejó un cultivo como un control no inducido, mientras que los otros tres se indujeron con IPTG 1 mM durante 15 minutos, 30 minutos o 60 minutos. Al final de sus incubaciones respectivas, se prepararon células competentes de los cuatro cultivos de la siguiente manera. Las células se sedimentaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se extrajeron y cada sedimento se resuspendió en 62,5 ml de H₂O helado. Los cultivos se sedimentaron de nuevo, el sobrenadante se extrajo y cada sedimento se resuspendió en 31,25 ml de glicerol 10 % frío. Los cultivos se centrifugaron después a 8000 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos se extrajeron bien y se resuspendieron en glicerol 10 % residual.

25 Los cuatro cultivos se dividieron en seis alícuotas de 50 µl que se transformaron de las siguientes maneras: 1) control negativo sin ADN, 2) control positivo con 1 µl de pBR322 (1 µg/µl) (New England Biolabs), 3) control positivo de 1 µl de pTAP279 (1 µg/µl), 4) control positivo de 1 µl de pSDH185, 5) 2 µl de fragmento tet^P::tet (50 ng/µl) y 6) 4 µl de fragmento tet^P::tet (50 ng/µl). Las células se transformaron por electroporación como se ha descrito anteriormente para *E. coli*. Se sembraron mezclas de transformación completas en placas LB que contenían tetraciclina 10 mg/l (Sigma) excepto para los controles de pTAP279, que se sembraron en placas de LB que contenían cloranfenicol 35 mg/l (Sigma). Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche. Además, se sembraron diluciones de 10⁻⁶ y 10⁻⁷ (en H₂O) de cada uno de los cuatro cultivos en placas de LB para evaluar la eficacia global del procedimiento de recombinación determinando el número de células.

30 Al día siguiente, las placas de control se sacaron del incubador y se evaluaron. Se permitió que las muestras transformadas con los fragmentos tet^P::tet se incubaran durante 24 horas adicionales antes del ensayo. Se identificaron veintiséis de los mayores clones para análisis adicional.

Caracterización de clones deficientes en ompT

40 Cada uno de los 26 clones seleccionados se cultivó durante una noche a 37 °C en 1 ml de LB con tetraciclina 5 µg/ml. Al día siguiente, se generó ADN genómico de los 26 clones usando el kit de aislamiento de ADN Genomic Prep (Amersham Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 El ADN genómico de cada clon se diluyó 1:100 en dH₂O para usarse como un molde para análisis por PCR. Cada muestra diluida se ensayó usando tres conjuntos diferentes de cebadores de PCR (tres reacciones de PCR por clon). Las reacciones contenían 100 pmoles de cada uno de los conjuntos de cebadores N° 1: ZG45.357 (SEC ID N°: 29) y ZG45.350 (SEC ID N°: 30) o el conjunto de cebadores N° 2: ZG45.353 (SEC ID N°: 31) y ZG45.355 (SEC ID N°: 32) o el conjunto de cebadores N° 3: ZG45.354 (SEC ID N°: 33) y ZG45.359 (SEC ID N°: 34). El resto del volumen final de 100 µl se compuso de 10 µl de tampón de PCR 10 X (Boehringer Mannheim), 1 µl de polimerasa Pwo (Boehringer Mannheim), 10 µl de la mezcla de nucleótido trifosfato 0,25 mM (Perkin Elmer) y dH₂O. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 2 minutos a 72 °C. La PCR concluyó con una extensión de 7 minutos a 72 °C y un mantenimiento durante una noche a 4 °C. Si el gen de OmpT en W3110 se reemplazara de forma exitosa con el gen de tetraciclina, el conjunto de cebadores N° 1 debería amplificar una banda de 1584 pb (SEC ID N°: 35), el conjunto de cebadores N° 2 debería amplificar una banda de 1190 pb (SEC ID N°: 42). Los resultados demostraron que 25 de los 26 clones explorados fueron ompT⁻. Los clones de W3110 ompT⁻ N° 1 y N° 3 se seleccionaron para análisis posterior.

55 Para confirmar la pérdida de actividad proteolítica, se incubó Il-21 con lisados celulares de las cepas de OmpT derivadas de nuevo y el parental W3110. Se incluyó el lisado de la cepa OmpT⁻, BL21, como un control positivo. Las

células se inocularon en Superbroth II y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Se sedimentaron cuatro alícuotas de 1 ml de cada cultivo de una noche a temperatura y las células se lisaron usando BugBuster® (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se incubaron a 25 °C durante 4 horas con: 1) IL-21 0,332 mg/ml o 2) IL-21 0,332 mg/ml en presencia de ZnCl₂ 5 mM. Cada muestra se mezcló con un volumen igual de tampón de muestra NuPAGE 4 x (Invitrogen) que contenía β-mercaptoetanol 2 % (Sigma). Las muestras reducidas se calentaron durante 5 minutos a 100 °C y se cargaron 10 μl en un gel de poliacrilamida NuPAGE 10 % (Invitrogen). Se realizó electroforesis a 130 v en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) usando un tampón de ejecución MES 1x (Invitrogen). Los geles se tiñeron con Simply Blue Safestain (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados indicaron que la proteasa OmpT se inactivó a través de reemplazo génico. IL-21 estaba completamente intacta después de una incubación de 4 horas en lisados de BL21, W3110 ompT⁻ N° 1 y W3110 ompT⁻ N° 3, pero estaba completamente degradada en un lisado del parental W3110. La actividad de la proteasa OmpT se inhibió por zinc. En incubaciones que contenían ZnCl₂ 5 mM la FGF18 permaneció intacta, apoyando que OmpT era responsable de la degradación. Las cepas de W3110 ompT⁻ de nueva construcción se nombraron zGOLD1 (W3110 ompT⁻ N° 1; (depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Manassas, VA. (PA-4853)) y zGOLD3 (W3110 ompT⁻ N° 3).

Caracterización de zGOLD1 y zGOLD3

zGOLD1 y zGOLD3 se cultivaron junto con el parental W3110 para la evaluación del crecimiento. Los cultivos de las tres cepas se dejaron crecer a 37 °C en LB a una DO₆₀₀ de 1,0. La densidad celular se midió cada hora para evaluar el crecimiento. Se sembraron diluciones (10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en H₂O) de cada cultivo en placas de kanamicina de LB (véase anteriormente) para determinar el número de células. Los resultados indican que el crecimiento de las cepas zGOLD es equivalente al de la cepa parental W3110.

Para evaluar la eficacia de transformación se recogieron células y se hicieron competentes para transformación como se ha descrito anteriormente. Se transformaron alícuotas de cada cepa con: 1) 1 μl de pTAP337 (plásmido de expresión de IL-21; ATCC N° PA-4853) o 2) sin ADN (control negativo). Se llevó a cabo electroporación como se ha descrito anteriormente. Después de la recuperación, cada mezcla de transformación se sembró en una placa de LB que contenía kanamicina 25 mg/l y se incubó durante una noche a 37 °C. Los datos indican que la eficacia de transformación de W3110 no se vio afectada por la retirada de ompT.

Se seleccionaron diez clones de cada cepa de zGOLD transformada con el vector de expresión de FGF18 para evaluar la producción de proteínas. Los clones se cultivaron a 37 °C durante una noche en Superboth II (que contenía kanamicina 25 μg/ml. Los cultivos de una noche se usaron para inocular rodillos que contenían Superboth II con kanamicina 25 μg/ml. Las células se cultivaron a 37 °C. Se dejó crecer un segundo cultivo de uno de los clones y sirvió como un control no inducido. Cuando la DO₆₀₀ fue de 1,5-2,0, se indujeron con IPTG 1 mM (ICN Biomedicals Inc.). La incubación de los cultivos continuó durante otras 5 cinco horas. Las muestras de cada cultivo se analizaron por SDS-PAGE en gel de NuPAGE de gradiente 4-12% (Invitrogen) en condiciones reductoras como se ha descrito anteriormente. Los resultados indican que la producción de FGF18 por zGOLD1 y zGOLD3 es equivalente a la de la cepa parental W3110. zGOLD1/pTAP337 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Manassas, VA. (PA-4853)) es un ejemplo de zGOLD1 transformado con un vector de expresión.

Ejemplo 18

Se determinó que se deseaba una modificación adicional de la cepa zGOLD1 para aumentar la cantidad de proteína heteróloga haciendo a la cepa resistente a infección por bacteriófago particular. Usando procedimientos equivalentes a los descritos anteriormente, se identificó el gen fhuA en la cepa zGOLD1 y se interrumpió. Este gen se identificó originalmente por Fecker y Braun, J. Bacterio., 156:1301 (1983). Las cepas fhuA⁻ se conocen bien en la técnica y proporcionan resistencia a infección por fagos T-impar. Tales cepas se describen, por ejemplo, en Boheivers y col. Biochem., 40:2606 (2001). La cepa doblemente alterada (ompT⁻, fhuA⁻) se nombró zGOLD5.

Generación de fragmento de gen de cloranfenicol acetiltransferasa

Se usaron los oligos zc48544 (SEC ID N°: 37) y zc48545 (SEC ID N°: 38) para amplificar el gen cat, que codifica cloranfenicol acetiltransferasa. zc48544, el oligo sentido, consiste en dos partes. En el extremo 5', el oligo se compone de 70 bases que flanquean la secuencia codificante fhuA. Esta secuencia termina justo 5' del codón de metionina inicial. La segunda mitad del oligo consiste en 23 bases homólogas de la región promotora del gen cat. zc48545, el oligo antisentido, se diseña de forma parecida al oligo sentido. El extremo 5' del oligo consiste en 73 bases que flanquean el extremo 3' de la secuencia codificante fhuA, incluyendo el codón de parada. Las siguientes 23 bases son homólogas del extremo 3' del gen de cat.

Para amplificar el gen cat con la secuencia flanqueante de fhuA, se usaron las siguientes concentraciones finales de reactivos en un volumen total de reacción de 100 μl: 0,2 pM de cada oligo; dNTP 0,2 mM; tampón de reacción 1X; DMSO 10%; y Pwo 0,05 U/μl (Roche). El molde usado para amplificación del gen cat fue pRARE (Novagen). La reacción consistía en 25 ciclos de lo siguiente: 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C

durante 1 minuto. Esto se realizó por duplicado. El fragmento de ADN resultante se analizó por electroforesis en un gel de agarosa TBE 1X 1 %. El tamaño del fragmento fue de aproximadamente 1 kb, como se esperaba. El fragmento de ADN se cortó del gel y se purificó de la agarosa usando un Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen). Se determinó que la concentración del ADN recuperado era 110 ng/μl por análisis espectrofotométrico.

5 Reemplazo génico: delección del gen fhuA en ZGOLD1

Se prepararon células ZGOLD1 electrocompetentes que contenían pCHAN1. Se usaron 100 μl del cultivo de una noche para inocular 50 ml de medio LB, que contenía kanamicina 25 μg/ml, en un matraz de agitación. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C con agitación hasta que la DO₆₀₀ fue de aproximadamente 0,6. En este punto los cultivos se indujeron usando IPTG 1 mM y se permitió que crecieran durante 15 minutos. Los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 5.000 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en medio volumen de agua helada. Las células se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se descartó y el sedimento resultante se resuspendió en un cuarto de volumen de glicerol 10 % helado. Las células se centrifugaron una última vez, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en el glicerol residual.

Se transformaron doscientos nanogramos del producto de PCR purificado en las células electrocompetentes en cubetas de 0,1 cm sometidas a pulsos a 2,0 kV, 25 μF y 400 Ω. Después de la electroporación, se permitió que las células se recuperaran en 0,6 ml de SOC [Bacto Triptona 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM] durante una hora a 37 °C. Las células se sembraron en placas como alícuotas de 10 μl y 100 μl en placas LB Cm [caldo LB (Lennox), Bacto Agar 1,8 % (Difco), cloranfenicol 10 μg/ml (Sigma)]. Además, se sembraron las células restantes. Las células sembradas se incubaron a 37 °C durante una noche.

Por lo tanto, este enfoque se usó para inactivar el gen fhuA en ZGOLD. El gen cat con la secuencia flanqueante de fhuA se generó por PCR. Después de la purificación en gel, se transformaron 200 ng del producto de PCR purificado en células ZGOLD1 electrocompetentes que contenían pCHAN1. Las células se sembraron en agar LB que contenía cloranfenicol a 10 μg/ml. Las células sembradas se incubaron a 37 °C durante una noche. Se seleccionaron seis colonias para análisis adicional. Se realizó una exploración de PCR con respecto a la presencia del gen cat en las bacterias transformadas usando los oligos zc46.701 (SEC ID N°: 39) y zc46.702 (SEC ID N°: 40). Estos dos cebadores hibridan con el ADN genómico que flanquea la secuencia codificante fhuA. Por lo tanto, se amplificaría fhuA o cat. Si estuviera presente fhuA, el producto de PCR resultante sería de aproximadamente 2,3 kb, pero si estuviera presente cat, el producto de PCR resultante sería de aproximadamente 1,1 kb. Se incluyó un cultivo de ZGOLD1 como un control. Todos los clones explorados produjeron una banda de aproximadamente 1,1 kb, el tamaño del gen cat. Los resultados indican que fhuA está ausente del fondo genómico de ZGOLD1.

Se presentó bacteriófago T-impar a clones que carecían del gen fhuA. W3110 es una cepa sensible a fago y se seleccionó como un control negativo. 27C7 (ATCC) es resistente a bacteriófagos T-impares y se seleccionó como un control positivo. El bacteriófago T5 obtenido de ATCC, se resuspendió en LB y se diluyó 1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000. Se aplicaron en puntos cinco microlitros de fago y cada dilución de fago en agar de superficie solidificada que contenía bacterias. Se permitió que las placas se secaran y se incubaran a 37 °C durante 24 horas. El bacteriófago T5 formó placas en las placas inoculadas con W3110. Por el contrario, no se formaron placas en las placas inoculadas con 27C7 y los seis clones sin fhuA. Los resultados indican que los seis clones sin fhuA son resistentes a bacteriófago T-impar.

Los seis clones sin fhuA se cultivaron durante una noche a 37 °C en ausencia de selección. Cada clon se extendió en agar LB que contenía cloranfenicol a 10 μg/ml. Cada clon se volvió a extender en agar LB con o sin kanamicina a 25 μg/ml. Las células de *E. coli* se cultivaron durante una noche a 37 °C. Todos los clones crecieron en agar LB y no creció ningún clon en agar LB que contenía kanamicina. Los resultados demuestran que todos los clones han perdido el plásmido pCHAN1. Se seleccionó un asilado y se guardó como una reserva de glicerol. Este aislado se designó ZGOLD5.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

50 <120> PRODUCCIÓN DE FGF18 EN HUÉSPEDES PROCARIOTAS

<130> 04-18PC

<150> 60/635.023

55 <151> 10-12-2004

<160> 40

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

60

<210> 1
 <211> 5262
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Vector de expresión

<400> 1

10

```

ccgacacat  cgaatggtgc  aaaacctttc  gcggtatggc  atgatagcgc  ccggaagaga  60
gtcaattcag  ggtggtgaat  gtgaaaccag  taacgttata  cgatgtcgca  gagtatgccg  120
gtgtctctta  tcagaccggt  tcccgcgtgg  tgaaccaggc  cagccacggt  tctgcgaaaa  180
cgcgggaaaa  agtggaaagc  gcgatggcgg  agctgaatta  cattccaac  cgcgtagcac  240
aacaactggc  gggcaaacag  tcggtgctga  ttggcgttgc  cacctccagt  ctggccctgc  300
acgcgccgtc  gcaaattgtc  gcggcgatta  aatctcgcgc  cgatcaactg  ggtgccagcg  360
tgggtggtgtc  gatggtagaa  cgaagcggcg  tcgaagcctg  taaagcggcg  gtgcacaatc  420
ttctcgcgca  acgcgtcagt  gggctgatca  ttaactatcc  gctggatgac  caggatgcca  480
ttgctgtgga  agctgcctgc  actaatgttc  cggcgttatt  tcttgatgtc  tctgaccaga  540
caccatcaa  cagtattatt  ttctcccatg  aagacggtag  gcgactgggc  gtggagcatc  600
tggtcgcatt  gggtcaccag  caaatcgcgc  tgtagcggg  cccattaagt  tctgtctcgg  660
cgcgctctgc  tctggctggc  tggcataaat  atctcactcg  caatcaaatt  cagccgatag  720
cggaacggga  aggcgactgg  agtgccatgt  ccggttttca  acaaaccatg  caaatgctga  780
atgagggcat  cgttccact  gcgatgctgg  ttgccaacga  tcagatggcg  ctgggcgcaa  840
tgcgcgccat  taccgagtc  gggctgcgcg  ttggtgcgga  tatctcggtg  gtgggatagc  900
acgataccga  agacagctca  tgttatatcc  cgccgttaac  caccatcaa  caggattttc  960
gcctgctggg  gcaaaccagc  gtggaccgct  tgctgcaact  ctctcagggc  caggcgggta  1020
agggcaatca  gctgttgccc  gtctcactgg  tgaaaagaaa  aaccaccctg  gcgcccaata  1080
cgcaaaccgc  ctctcccgc  gcgttgccg  attcattaat  gcagctggca  cgacagggtt  1140
cccgactgga  aagcgggcag  tgagcgaac  gcaattaatg  tgagttagct  cactcattag  1200
gcacaattct  catgttgac  agcttatcat  cgctcagc  gtgcaccaat  gcttctggcg  1260
tcaggcagcc  atcggaaagt  gtggtatggc  tgtgcaggtc  gtaaatcact  gcataattcg  1320
tgtcgtcaa  ggcgcactcc  cgttctggat  aatgtttttt  gcgccgacat  cataacggtt  1380
ctggcaaata  ttctgaaatg  agctgttgac  aattaatcat  cggctcgtat  aatgtgtgga  1440
attgtgagcg  gataacaatt  tcacacagaa  ttcattaag  aggagaaatt  aactatggaa  1500
gaaaacggtg  atttccgtat  tcacgttgag  aaccagactc  gcgcacgcga  cgacgtatct  1560
cgtaagcagc  tgcgtctgta  ccagctgtac  tcccgtactt  ccggtaagca  cattcagggt  1620
ctgggtcgtc  gcatctctgc  gcgggcgaa  gatggcgaca  aatacgtc  gctgctgggt  1680
gagaccgaca  ccttcggctc  ccaggtacgc  attaaaggca  aagagactga  attctacctg  1740
tgcataaac  gcaaaggtaa  gctggttgg  aagccggatg  gtacctcaa  agaatgcgtt  1800
ttcatcgaga  aagttctgga  gaacaactac  accgctctga  tgtctgcgaa  atacagcggc  1860
tggtagcttg  gtttacc  gaaaggtcgt  ccgcgtaaag  gtccgaagac  ccgtgagaac  1920
cagcaggacg  tgcacttcat  gaaacgttac  ccgaaaggcc  agccggagct  gcagaagccg  1980
ttcaaataca  ccaccgtgac  caaacgttct  cgtcgtattc  gtccgactca  tccagcataa  2040
tgttttggcg  atgagataag  atttcagcc  tgatacagat  taaatcagaa  cgagaagcg  2100
gtctgataaa  acagaatttg  cctggcggca  gtagcgcggt  ggtcccact  gaccccatgc  2160
cgaactcaga  agtgaaacgc  cgtagcggcg  atggtagtgt  ggggtctccc  catgagagag  2220
tagggaactg  ccaggcatca  aataaacga  aaggctcagt  cgaaagactg  ggccttctgt  2280
tttatctgtt  gttgtcgg  gaacgctctc  ctgagtagga  caaatccgc  gggagcggat  2340
ttgaacggtg  cgaagcaacg  gccggagg  tggcggcgag  gacgcccgcc  ataaactgcc  2400
aggcatcaaa  ttaagcagaa  ggccatctg  acggatggcc  tttttgcgtt  tctacaaact  2460
    
```

ctttgcgggc	gcaatggccg	ccacggttgg	tctcaaaatc	tctgatgtta	cattgcacaa	2520
gataaaaaata	tatcatcatg	aacaataaaa	ctgtctgctt	acataaacag	taataacaagg	2580
ggtgttatga	gccatattca	acgggaaacg	tcttgcctcga	ggccgcgatt	aaattccaac	2640
atggatgctg	atztatatgg	gtataaatgg	gctcgcgata	atgtcgggca	atcagggtgcg	2700
acaatctatc	gattgtatgg	gaagcccgat	gcgccagagt	tgittctgaa	acatggcaaa	2760
ggtagcgttg	ccaatgatgt	tacagatgag	atggctcagac	taaactggct	gacggaattt	2820
atgcctcttc	cgaccatcaa	gcattttatc	cgtactcctg	atgatgcatg	gttactcacc	2880
actgcgatcc	cagggaaaac	agcattccag	gtattagaag	aatatcctga	ttcagggtgaa	2940
aatattgttg	atgctgtggc	agtgttctctg	cgccggttgc	attcgattcc	tgtttgtaat	3000
tgctctttta	acagcgatcg	cgtatttctgt	ctcgcctcagg	cgcaatcacg	aatgaataac	3060
ggtttgggtg	atgctgagtga	ttttgatgac	gagcgtaatg	gctggcctgt	tgaacaagtc	3120
tggaagaaaa	tgcataagct	tttgccattc	tcaccggatt	cagtcgtcac	tcatggtgat	3180
ttctcacttg	ataaccttat	ttttgacgag	gggaaattaa	taggttgat	tgatggtgga	3240
cgagtcggaa	tcgcagaccg	ataccaggat	cttgccatcc	tatggaactg	cctcgggtgag	3300
ttttctcctt	cattacagaa	acggcttttt	caaaaatatg	gtattgataa	tcctgatatg	3360
aataaattgc	agtttcattt	gatgctcgat	gagtttttct	aatcagaatt	ggttaattgg	3420
ttgtaacact	ggcagagcat	tacgctgata	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	3480
atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	3540
aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	ttttctcgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	3600
caaaaaaac	accgctacca	gcggtgggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	3660
ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	3720
cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacttc	gctctgctaa	3780
tcctgttacc	agtggctgct	gccagtgggc	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	3840
gacgatagtt	accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	3900
ccagcttggg	gcgaaccgac	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	3960
gcgccacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	4020
caggagagcg	cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	4080
ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggaggagcc	4140
tatggaaaaa	cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttctt	ggccttttgc	tgcccttttg	4200
ctcacatggt	ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	4260
agtgagctga	taccgctcgc	cgccagccgaa	cgaccgagcg	cagcagatca	gtgagcgagg	4320
aagcgggaaga	gcgcctgatg	cggtattttc	tccttacgca	tctgtgcggt	atttcacacc	4380
gcatatgggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagtatacac	4440
tccgctatcg	ctacgtgact	gggtcatggc	tgccgcccga	cacccgcaa	cacccgctga	4500
cgcccttga	cggtcttgtc	tgctcccggc	atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	4560
cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga	ggcagctgcg	4620
gtaaagctca	tcagcgtggt	cgtgcagcga	ttcacagatg	tctgcctggt	catccgcgtc	4680
cagctcgttg	agtttctcca	gaagcgttaa	tgctctggctt	ctgataaagc	gggcatggt	4740
aaggcgggtt	ttttcctggt	tggtcacttg	atgcctccgt	gtaaggggga	atttctgttc	4800
atgggggtaaa	tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	4860
gaacatgccc	ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacac	tggcggtatg	gatgcggcgg	4920
gaccagagaaa	aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgttctg	ttataacaga	tgtagggtgt	4980
ccacagggta	gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggt	gcagggcgct	5040
gacttccgcg	tttccagact	ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tgttgttget	5100
caggtcgcag	acgttttgca	gcagcgttcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cggtgattca	5160
ttctgctaac	cagtaaggca	accgcgctcg	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	5220
atcatgcgca	cccgtggcca	ggaccaacg	ctgcccgaaa	tt		5262

<210> 2
 <211> 5230
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Vector de expresión trFGF18

10 <400> 2

ccgacaccat	cgaatgggtgc	aaaacctttc	gcggtatggc	atgatagcgc	ccggaagaga	60
gtcaattcag	ggtgggtgaat	gtgaaaccag	taacgttata	cgatgtcgca	gagtatgccg	120
gtgtctctta	tcagaccggt	tcccgcggtg	tgaaccaggc	cagccacggt	tctgcgaaaa	180
cgcgggaaaa	agtggaaagcg	gcgatggcgg	agctgaaata	cattcccaac	cgctgtggcac	240
aaacaactggc	gggcaaacag	tcggttgctga	ttggcgttgc	cacctccagt	ctggccctgc	300
acgcgcctgc	gcaaatgttc	gcggcgatta	aatctcgcgc	cgatcaactg	ggtgccagcg	360
tggtgggtgc	gatggtagaa	cgaagcggcg	tcgaagcctg	taaagcggcg	gtgcacaatc	420

ttctcgcgca	acgcgctcagt	gggctgatca	ttaactatcc	gctggatgac	caggatgcca	480
ttgctgtgga	agctgcctgc	actaatgttc	cggcgttatt	tcttgatgtc	tctgaccaga	540
cacccatcaa	cagtattatt	ttctcccatg	aagacggtac	gcgactgggc	gtggagcatic	600
tggtcgcatt	gggtcaccag	caaatcgcgc	tgtagcggg	cccattaagt	tctgtctcgg	660
cgctctgcg	tctggctggc	tggcataaat	atctcactcg	caatcaaatt	cagccgatag	720
cggaaacggga	aggcgactgg	agtgccatgt	ccggttttca	acaaacctg	caaagtctga	780
atgagggcat	cgttcccact	gcgatgctgg	ttgccaacga	tcagatggcg	ctgggcgcaa	840
tgcgcgccat	taccgagctc	gggctgcgcg	ttggtgcgga	tatctcggta	gtgggatacg	900
acgataccga	agacagctca	tggtatatcc	cgccgttaac	caccatcaaa	caggattttc	960
gcctgctggg	gcaaaccagc	gtggaccgct	tgctgcaact	ctctcagggc	caggcgggta	1020
agggcaatca	gctgttgccc	gtctcactgg	tgaaaagaaa	aaccacctg	gcgcccaata	1080
cgaaaccgc	ctctccccgc	gcggtggccg	atcattaat	gcagctggca	cgacagggtt	1140
cccgactgga	aagcgggcag	tgagcgcac	gcaattaatg	tgagttagct	cactcattag	1200
gcacaattct	catgtttgac	agcttatcat	cgactgcacg	gtgcaccaat	gcttctggcg	1260
tcaggcagcc	atcggaaget	gtggtatggc	tgtgcaggct	gtaaatcact	gcataattcg	1320
tgctgctcaa	ggcgcactcc	cgttctggat	aatgtttttt	gcgccgacat	cataacggtt	1380
ctggcaata	ttctgaaatg	agctgttgac	aattaatcat	cggctcgtat	aatgtgtgga	1440
attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagaa	ttcattaag	aggagaaat	aactatggaa	1500
gaaaacgttg	atctccgtat	tcacgttgag	aaccagactc	gcgcacgcga	gcagctatct	1560
cgtaagcagc	tgctctgtga	ccagctgtac	tcccgtactt	ccggtaaagc	cattcaggtt	1620
ctgggtcgtc	gcatctctgc	gcgcggcgaa	gatggcgaca	aatacgtca	gctgctggtt	1680
gagaccgaca	ccttcggctc	ccaggtacgc	attaagggca	aagagactga	attctacctg	1740
tgcatgaacc	gcaaaggtaa	gctggttgg	aagccggatg	gtacctcaa	agaatgcggt	1800
ttcatcgaga	aagttctgga	gaacaactac	accgctctga	tgctcgcgaa	atacagcggc	1860
tggtacgttg	gtttcaccaa	gaaaggctcg	ccgcgtaaag	gtccgaagac	ccgtgagaac	1920
cagcaggacg	tgactttcat	gaaacgttac	ccgaaaggcc	agccggagct	gcagaagccg	1980
ttcaaatata	ccaccgtgac	caaataatgt	tttggcggat	gagataagat	tttcagcctg	2040
atacagatta	aatcagaacg	cagaagcgg	ctgataaaac	agaatttgcc	tggcggcagt	2100
agcgcggttg	tcccactga	ccccatggc	aactcagaag	tgaaaacgccg	tagcggcagt	2160
ggtagtgtgg	ggtctcccca	tgcgagagta	gggaactgcc	aggcatcaaa	taaaacgaaa	2220
ggctcagctc	aaagactggg	cctttcgttt	tatctgttgt	ttgtcgggta	acgctctect	2280
gagtaggaca	aatcgcgccc	gagcggattt	gaacgttgcg	aagcaacggc	ccggagggtg	2340
cggggcagga	cgcccgccat	aaactgccag	gcatcaaatt	aagcagaagg	ccatctgac	2400
ggatggcctt	tttgcgtttc	tacaaactct	ttgcggccgc	aatggccg	acgttctgtc	2460
tcaaaatctc	tgatgttaca	ttgcacaaga	taaaaatata	tcaicatgaa	caataaaact	2520
gtctgcttac	ataaacagta	atacaagggg	tgttatgagc	catattcaac	gggaaacgct	2580
ttgctgcagg	ccgcgattaa	attccaacat	ggatgctgat	ttatatgggt	ataaatgggc	2640
tcgcgataat	ctcgggcaat	caggtgcgac	aatctatcga	ttgtatggga	agcccgatgc	2700
gccagagttg	tttctgaaac	atggcaagg	tagcgttgcc	aatgatgta	cagatgagat	2760
ggtcagacta	aactggctga	cggaatttat	gcctcttccg	accatcaagc	atittatccg	2820
tactcctgat	gatgcatggt	tactcaccac	tgcatccca	gggaaaacag	cattccaggt	2880
attagaagaa	tatctgatt	tacttgaaaa	tattgttgat	gcgctggcag	tgttcctg	2940
ccggttgcat	tcgattcctg	tttgtaattg	tccttttaac	agcgatcgcg	tattctgtct	3000
cgctcaggcg	caatcacgaa	tgaataacgg	tttggttgat	gcgagtgatt	ttgatgacga	3060
gcgtaatggc	tggcctgttg	aacaagtctg	gaaagaaatg	cataagcttt	tgccattctc	3120
accggattca	gtcgtcactc	atggtgattt	ctcacttgat	aaccttattt	ttgacgaggg	3180
gaaatttaata	ggttgatttg	ggttgagcg	agtccgaatc	gcagaccgat	accaggatct	3240
tgccatccta	tggaaactgcc	tcggtgagtt	ttctccttca	ttacagaaac	ggcttttca	3300
aaaatatggt	attgataatc	ctgatatgaa	taaattgcag	tttcatttga	tgctcgatga	3360
gtttttctaa	tcagaattgg	ttaattgggt	gtaacactgg	cagagcatta	cgctgataaa	3420
aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	3480
tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	gatcttcttg	agatcctttt	3540
tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaac	aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtggtttgt	3600
ttgcccgatc	aagagctacc	aactctttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	3660
ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	3720
gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaatt	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	3780
aagtctgttc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	cgataaggc	gcagcggctc	3840
ggctgaaacg	ggggttcgty	cacacagccc	agcttggagc	gaacgacct	caccgaaactg	3900
agatacctac	agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	ccgaaggag	aaaggcggac	3960
aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaac	ggagagcgca	cgagggagct	tccaggggga	4020
aacgcctggt	atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	4080
ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tcgaaaacg	ccagcaacg	ggccttttta	4140
cggttcctg	gcttttgctg	gccttttgct	cagatgttct	ttcctgctgt	atcccctgat	4200
tctgtggata	accgatttac	cgcttttgag	tgagctgata	ccgctcgcg	cagccgaacg	4260
accgagcgca	gcyagtcagt	gagcgggaa	gcggaagagc	gcctgatgcg	gtattttctc	4320
cttacgcatc	tgtcgggtat	ttcacaccgc	atatggtgca	ctctcagtac	aatctgctct	4380

ES 2 371 219 T3

```

gatgccgcat agttaagcca gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg gtcattggctg 4440
cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat 4500
ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 4560
catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggt aaagctcatc agcgtggctg tgcagcgatt 4620
cacagatgtc tgcctgttca tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga agcgttaatg 4680
tctggcttct gataaagcgg gccatgttaa gggcggtttt ttctgtttg gtcacttgat 4740
gcctccgtgt aagggggaat ttctgttcat gggggtaatg ataccgatga aacgagagag 4800
gatgctcacg atacgggtta ctgatgatga acatgcccgg ttactggaac gttgtgaggg 4860
taaacaactg gcggtatgga tgcggcggga ccagagaaaa atcactcagg gtcaatgcca 4920
gcgcttcggt aatacagatg taggtgttcc acagggtagc cagcagcatc ctgcatgca 4980
gatccggaac ataatgggtc agggcgctga cttccgcggt tccagacttt acgaaacacg 5040
gaaaccgaag accattcatg ttgttgctca ggtcgcagac gttttgcagc agcagtcgct 5100
tcacgttcgc tcgcgtatcg gtgattcatt ctgctaacca gtaaggcaac cccgccagcc 5160
tagccgggtc ctcaacgaca ggagcacgat catgcgccac cgtggccagg acccaacgct 5220
gccccaaatt

```

<210> 3

<211> 546

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Codones optimizados para FGF18

10 <221> CDS

<222> (1)...(546)

<400> 3

ES 2 371 219 T3

atg gaa gaa aac gtt gat ttc cgt att cac gtt gag aac cag act cgc	48
Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg	
1 5 10 15	
gca cgc gac gac gta tct cgt aag cag ctg cgt ctg tac cag ctg tac	96
Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr	
20 25 30	
tcc cgt act tcc ggt aag cac att cag gtt ctg ggt cgt cgc atc tct	144
Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser	
35 40 45	
gcg cgc ggc gaa gat ggc gac aaa tac gct cag ctg ctg gtt gag acc	192
Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr	
50 55 60	
gac acc ttc ggc tcc cag gta cgc att aaa ggc aaa gag act gaa ttc	240
Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe	
65 70 75 80	
tac ctg tgc atg aac cgc aaa ggt aag ctg gtt ggt aag ccg gat ggt	288
Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly	
85 90 95	
acc tcc aaa gaa tgc gtt ttc atc gag aaa gtt ctg gag aac aac tac	336
Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr	
100 105 110	
acc gct ctg atg tct gcg aaa tac agc ggc tgg tac gtt ggt ttc acc	384
Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr	
115 120 125	
aag aaa ggt cgt ccg cgt aaa ggt ccg aag acc cgt gag aac cag cag	432
Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln	
130 135 140	
gac gtg cac ttc atg aaa cgt tac ccg aaa ggc cag ccg gag ctg cag	480
Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln	
145 150 155 160	
aag ccg ttc aaa tac acc acc gtg acc aaa cgt tct cgt cgt att cgt	528
Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg	
165 170 175	
ccg act cat cca gca taa	546
Pro Thr His Pro Ala *	
180	

<210> 4
 <211> 181
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína FGF18

10 <400> 4

ES 2 371 219 T3

```

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

```

<210> 5
 <211> 513
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Codones optimizados para trFGF18
 10 <221> CDS
 <222> (1)...(513)

<400> 5

```

atg gaa gaa aac gtt gat ttc cgt att cac gtt gag aac cag act cgc 48
Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1      5      10      15
gca cgc gac gac gta tct cgt aag cag ctg cgt ctg tac cag ctg tac 96

```

15

Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Ser	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Leu	Tyr	Gln	Leu	Tyr	
			20					25					30			
tcc	cgt	act	tcc	ggt	aag	cac	att	cag	ggt	ctg	ggt	cgt	cgc	atc	tct	144
Ser	Arg	Thr	Ser	Gly	Lys	His	Ile	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	Ser	
		35					40					45				
gcg	cgc	ggc	gaa	gat	ggc	gac	aaa	tac	gct	cag	ctg	ctg	ggt	gag	acc	192
Ala	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Glu	Thr	
	50					55					60					
gac	acc	ttc	ggc	tcc	cag	gta	cgc	att	aaa	ggc	aaa	gag	act	gaa	ttc	240
Asp	Thr	Phe	Gly	Ser	Gln	Val	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	
	65				70					75					80	
tac	ctg	tgc	atg	aac	cgc	aaa	ggt	aag	ctg	ggt	ggt	aag	ccg	gat	ggt	288
Tyr	Leu	Cys	Met	Asn	Arg	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Gly	
				85					90					95		
acc	tcc	aaa	gaa	tgc	ggt	ttc	atc	gag	aaa	ggt	ctg	gag	aac	aac	tac	336
Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Val	Phe	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr	
			100					105					110			
acc	gct	ctg	atg	tct	gcg	aaa	tac	agc	ggc	tgg	tac	ggt	ggt	ttc	acc	384
Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ser	Gly	Trp	Tyr	Val	Gly	Phe	Thr	
		115					120					125				
aag	aaa	ggt	cgt	ccg	cgt	aaa	ggt	ccg	aag	acc	cgt	gag	aac	cag	cag	432
Lys	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg	Lys	Gly	Pro	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn	Gln	Gln	
	130					135					140					
gac	gtg	cac	ttc	atg	aaa	cgt	tac	ccg	aaa	ggc	cag	ccg	gag	ctg	cag	480
Asp	Val	His	Phe	Met	Lys	Arg	Tyr	Pro	Lys	Gly	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	
	145				150					155					160	
aag	ccg	ttc	aaa	tac	acc	acc	gtg	acc	aaa	taa						513
Lys	Pro	Phe	Lys	Tyr	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	*						
				165					170							

- <210> 6
- <211> 170
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína trFGF18
- 10 <400> 6

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1 5 10 15
 Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 20 25 30
 Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 35 40 45
 Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
 50 55 60
 Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
 85 90 95
 Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
 100 105 110

Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 115 120 125
 Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
 130 135 140
 Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys
 165 170

5 <210> 7
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción
 <400> 7

aaccagcagc tgagcgtatt tgtcgccatc ttcgccgcgc gcagagatgc gacgaccag 60
aacctgaat 69

15 <210> 8
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción
 <400> 8

taagcagctg cgtctgtacc agctgtactc ccgtacttcc ggtaagcaca ttcaggttct 60
gggtcgt 67

25 <210> 9
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

ES 2 371 219 T3

<400> 9
 tacagacgca gctgcttacg agatacgtcg tcgcggtcgc gagtctggtt ctaacgtga 60

5 <210> 10
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 10
 atggaagaaa acgttgattt ccgtattcac gttgagaacc agact 45

15 <210> 11
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 11
tacgctcagc tgctggttga gaccgacacc ttcggctccc aggtacgcat taaaggcaaa 60
gagactgaat tct 73

25

<210> 12
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

35 <400> 12
 ttaccaacca gcttaccttt gcggttcattg cacaggtaga attcagtcct tttgcct 57

<210> 13
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

45 <400> 13
 tctgatgtct gcgaaataca gcggctggta cgttggtttc accaagaaag gtcgt 55

<210> 14
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

55 <400> 14
 tgtatttcgc agacatcaga gcgggtgtagt tgttctccag aactttctcg at 52

60 <210> 15
 <211> 80
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de construcción

5 <400> 15

aggacgtgca cttcatgaaa cgttacccga aaggccagcc ggagctgcag aagccgttca 60
aatacaccac cgtgaccaa 80

10 <210> 16
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 16

20 **ttcatgaagt gcacgtcctg ctggttctca cgggtcttcg gacctttacg cggacgacct 60**
ttcttggtga aa 72

<210> 17
<211> 70
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de construcción

30 <400> 17

aaggtaaagct ggttggtgta cggatggta cctccaaaga atgcgttttc atcgagaaag 60
ttctggagaa 70

<210> 18

35 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 18

ttatgctgga tgagtcggac gaatacgcag agaacggttg gtcacggtgg tgta 54

45 <210> 19
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 19

ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa 50

55 <210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 20

5 tctgatttaa tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cg 42

<210> 21

<211> 62

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de construcción

15 <400> 21

gtggaattgt gagcggataa caatttcaca cagaattcat taaagaggag aaattaactc 60
cc 62

<210> 22

20 <211> 63

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 22

gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca cccgggagtt aatttctcct cttaaatagaa 60
ttc 63

<210> 23

30 <211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 23

40

acaatttcac acagaattca ttaaagagga gaaattaact atggatatta atactgaaac 60
tgag 64

<210> 24

45 <211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 24

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca tcategccat tgctceccaa 60
atac 64

55 <210> 25

<211> 1965

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Operón de recombinasa Red

<400> 25

```

acaatttcac acagaattca ttaaagagga gaaattaact atggatatta atactgaaac 60
tgagatcaag caaaagcatt cactaacccc ctttcctgtt ttcctaataca gcccggcatt 120
tcgcgggcga tattttcaca gctatttcag gagttcagcc atgaacgctt attacattca 180
ggatcgtctt gaggctcaga gctgggcgcg tcactaccag cagctcgccc gtgaagagaa 240
agaggcagaa ctggcagacg acatggaaaa aggcctgccc cagcacctgt ttgaatcgct 300
atgcatcgat catttgcaac gccacggggc cagcaaaaaa tccattaccg gtgctgttga 360
tgacgatggt gagtttcagg agcgcacatc agaacacatc cggtagatgg ttgaaacatc 420
tgctcaccac caggttgata ttgattcaga ggtataaaac gaatgagtac tgactcgcga 480
acgctggctg ggaagctggc tgaacgtgtc ggcattggatt ctgtcgacct acaggaactg 540
atcaccactc ttcgccagac ggcatttaaa ggtgatgcca gcatgcgca gttcatcgca 600
ttactgatcg ttgccaaaca gtacggcctt aatccgtgga cgaaagaaat ttacgccttt 660
cctgataagc agaatggcat cgttccgggtg gtggcgttg atggctggtc ccgcatcacc 720
aatgaaaacc agcagtttga tggcatggac tttagcagg acaatgaatc ctgtacatgc 780
cggatttacc gcaaggaccg taatcatccg atctgctgta ccgaatggat ggatgaatgc 840
cgccgcgaac cattcaaaac tcgcgaaggc agagaaatca cggggccgtg gcagtcgcat 900
cccaaacgga tgttacgtca taaagccatg attcagtgtg cccgtctggc cttcggattt 960
gttggtatct atgacaagga tgaagccgag cgcattgtcg aaaatactgc atacactgca 1020
gaacgtcagc cggaacgcga catcactccg gttaacgatg aaaccatgca ggagattaac 1080
actctgctga tcgccctgga taaaacatgg gatgacgact tattgccgct ctgttcccag 1140
atatttcgcc gcgacattcg tgcactcgca gaactgacac aggcggaagc agtaaaagct 1200
cttgatttcc tgaacagaaa agccgcagag cagaaggtgg cagcatgaca ccggacatta 1260
tccctgacgc taccgggatc gatgtgagag ctgtcgaaac ggggatgat gcgtggcaca 1320
aattacggct cggcgtcacc accgcttcag aagttcaca cgtgatagca aaaccccgct 1380
ccggaagaa gtggcctgac atgaaaatgt cctacttcca caccctgctt gctgaggttt 1440
gcaccggtgt ggctccggaa gttaacgcta aagcactggc ctggggaaaa cagtacgaga 1500
acgacgccag aaccctgttt gaattcactt ccggcgtgaa tgttactgaa tccccgatca 1560
tctatcgca cgaagatag cgtaccgctt gctctcccga tggtttatgc agtgacggca 1620
acggccttga actgaaatgc ccgtttacct ccgggatttt catgaagttc cggctcgggtg 1680
gtttcaggc cataaagtca gcttacatgg cccagggtgca gtacagcatg tgggtgacgc 1740
gaaaaaatgc ctggctacttt gccaaactatg acccgctgat gaagcgtgaa ggcctgcatt 1800
atgtcgtgat tgagcgggat gaaaagtaca tggcgaatgt tgacgagatc gtgccggagt 1860
tcacgaaaa aatggacgag gcactggctg aaattggttt tgtatttggg gagcaatggc 1920
gatgatgttt tggcggatga gataagattt tcagcctgat acaga 1965
    
```

10 <210> 26
<211> 92
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido de construcción

20 <400> 26

```

attgttacat tgaatggct agttattccc cggggcgatt ttcacctcgg ggaatttta 60
gttggcgttc tcaggctcag gtggcccggc tc 92
    
```

25 <210> 27
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de construcción

30 <400> 27

taattgactc attaagttag atataaaaaa tacatattca atcattaataa cgattgaatg 60
gagaactttt attattgaag catttatcag ggttattgt 99

5 <210> 28
 <211> 1591
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de resistencia a tetraciclina
 <400> 28

taattgactc attaagttag atataaaaaa tacatattca atcattaataa cgattgaatg 60
gagaactttt attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 120
gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgca catttccccg aaaagtgcc 180
cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 240
aggccttctc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag 300
ttaaattgct aacgcagtc ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc 360
ctcggcaccg tcaccctgga tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc 420
ctcttgccgg atatcgtcca ttccgacagc atcggcagtc actatggcgt gctgctagcg 480
ctatacgcgt tgatgcaatt tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt 540
ggcgcggcc cagtcctgct cgcttcgcta ctggagcca ctatcgacta cgcgatcatg 600
gcgaccacac ccgtcctgtg gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc 660
gccacagggt cggttgctgg cgccatatac gccgacatca ccgatgggga agatcgggct 720
cgccacttcg ggctcatgag cgcttggttc ggcgtgggta tgggtggcagg ccccggtggc 780
gggggactgt tgggcgcat ctcccttgcac gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac 840
ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga 900
ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact 960
atcgtcgcgg cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca 1020
gcgctctggg tcattttcgg cgaggaccgc tttcgttggg gcgacgat gatcggcctg 1080
tcgcttgcgg tattcggaaat cttgcacgcc ctgcgtcaag ccttcgtcac tgggtcccgc 1140
accaaactgt tcggcgagaa gcaggccatt atcggcggca tggcggccga cgcgctgggc 1200
tacgtcttgc tggcgctcgc gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc 1260
gcttccggcg gcatcgggat gcccgcggtg caggccatgc tgteccaggca ggtagatgac 1320
gaccatcagg gacagcttca aggatcgtc gcggtcttta ccagcctaac ttcgatcact 1380
ggaccgctga tcgtcacggc gatttatgcc gccctcggcg gcacatggaa cgggttggca 1440
tggattgtag gcgcggccct ataccttgtc tgccctcccg cgttgcgtcg ggtgcatgg 1500
agcctggcca cctcgacctg agaacggcaa ctaaaatttc cccgaggtga aaatcgcccc 1560
ggggaataac tagccatttc aatgtaacaa t 1591

15 <210> 29
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 29
 tcattaagtt agatataaaa aatacatatt ca 32

25 <210> 30
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 30
 taattgttac attgaaatgg ctagtatt 29

<210> 31

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 31
 atgaaatcta acaatgcgct catgctc 27

10 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 32
 tcaggtcgag gggcccggc tc 22

20 <210> 33
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 33
 tctaccgaga ctttatcggt tactcct 27

30 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido de construcción

<400> 34
 ttaaaatgtg tacttaagac cagcagta 28

40 <210> 35
 <211> 1585
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Banda amplificada

50 <400> 35

tcattaagtt	agatataaaa	aatacatatt	caatcattaa	aacgattgaa	tggagaactt	60
ttattattga	agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	120
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	180
ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	ctataaaaaat	aggcgtatca	cgaggccttc	240
tcatgtttga	cagcttatca	tcgataagct	ttaatgcggt	agtttatcac	agttaaattg	300
ctaacgcagt	caggcaccgt	gtatgaaatc	taacaatgcg	ctcatcgta	tcctcggcac	360
cgtcaccctg	gatgctgtag	gcataggctt	ggttatgccg	gtactgccgg	gcctcttgcg	420
ggatatcgtc	cattccgaca	gcattcgccag	tcactatggc	gtgctgctag	cgctatatgc	480
gttgatgcaa	tttctatgcg	cacccgttct	cggagcactg	tccgaccgct	ttggccgccc	540
cccagtcctg	ctcgcttcgc	tacttgaggc	cactatcgac	tacgcatca	tggcgaccac	600
accgctcctg	tggatcctct	acgcccggacg	catcggtggc	ggcatcaccg	gcgccacagg	660
tgcggttgct	ggcgcctata	tcgcccagacat	caccgatggg	gaagatcggg	ctcgccactt	720
cgggctcatg	agcgttgtt	tcggcgtggg	tatggtggca	ggccccgtgg	ccgggggact	780
gttgggcgcc	atctccttgc	atgcaccatt	ccttgccggc	gcggtgctca	acggcctcaa	840
cttactactg	ggctgcttcc	taatgcagga	gtcgcataag	ggagagcgtc	gaccgatgcc	900
cttgagagcc	ttcaaccag	tcagctcctt	ccggtgggcg	cggggcatga	ctatcgctgc	960
cgcacttatg	actgtcttct	ttatcatgca	actcgtagga	caggtgccgg	cagcgtcttg	1020
ggtcattttc	ggcagggacc	gctttcgctg	gagcgcgacg	atgatcggcc	tgctcgttgc	1080
ggtattcgga	atcttgcacg	ccctcgctca	agccttcgtc	actggtcccg	ccaccaaacg	1140
tttcggcgag	aagcaggcca	ttatcgccgg	catggcggcc	gacgcgctgg	gctacgtctt	1200
gctggcgctc	gcgacgcgag	gctggatggc	cttccccatt	atgattcttc	tcgcttccgg	1260
cggcatcggg	atgcccgct	tcgaggccat	gctgtccagg	caggtagatg	acgaccatca	1320
gggacagctt	caaggatcgc	tcgcggtctt	taccagccta	acttcgatca	ctggaccgct	1380
gatcgtcacg	gcgatttatg	ccgcctcggc	gagcacatgg	aacgggttgg	catggattgt	1440
agggcggccc	ctataccttg	tctgcctccc	cgcgttgcgt	cgcggtgcat	ggagccgggc	1500
cacctcgacc	tgagaaacgc	aactaaaatt	tccccgaggt	gaaaatcgcc	ccggggaata	1560
actagccatt	tcaatgtaac	aatta				1585

<210> 36
 <211> 1191
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Banda amplificada

10 <400> 36

atgaaatcta	acaatgcgct	catcgtcatc	ctcggcaccg	tcaccctgga	tgctgtaggg	60
ataggcttgg	ttatgccggg	actgccgggc	ctcttgccgg	atategtcca	ttccgacagc	120
atcggcagtc	actatggcgt	gctgctagcg	ctatatgctg	tgatgcaatt	tctatgcgca	180
cccgttctcg	gagcactgtc	cgaccgcttt	ggccgcggcc	cagtcctgct	cgcttcgcta	240
cttggagcca	ctatcgacta	cgcgatcatg	gcgaccacac	ccgtcctgtg	gatcctctac	300
gccggacgca	tcgtggccgg	catcaccggg	gccacaggty	cggttgctgg	cgcttatatc	360
gccgacatca	ccgatgggga	agatcgggct	cgccacttcg	ggctcatgag	cgcttgcttc	420
ggcgtgggta	tggtggcagg	ccccgtggcc	gggggactgt	tgggcgccat	ctccttgcac	480
gcaccattcc	ttgcggcggc	ggtgctcaac	ggcctcaacc	tactactggg	ctgcttctca	540
atgcaggagt	cgcataaggg	agagcgtcga	ccgatgccct	tgagagcctt	caaccagctc	600
agctccttcc	ggtgggcgcg	ggcatgact	atcgtcggcc	cacttatgac	tgtcttcttt	660
atcatgcaac	tcgtaggaca	ggtgcccggc	gcgctctggg	tcattttcgg	cgaggaccgc	720
tttcgctgga	gcgcgacgat	gatcggcctg	tcgcttgccg	tattcggaat	cttgcacgcc	780
ctcgtctaa	ccttcgctac	tggtcccggc	accaaacggt	tcggcgagaa	gcaggccatt	840
atgcggcgca	tggcggccga	cgcgctgggc	tacgtcttgc	tggcgttcgc	gacgcgaggc	900
tggatggcct	tcccatttat	gattcttctc	gcttccgggc	gcatcgggat	tcccgcgttg	960
caggccatgc	tgtccaggca	ggtagatgac	gaccatcagg	gacagcttca	aggatcgctc	1020
gcggctctta	ccagcctaac	ttcgatcact	ggaccgctga	tcgtcacggc	gatttatgcc	1080
gcctcggcga	gcacatggaa	cgggttggca	tggattgtag	gcgccgccct	ataccttctc	1140
tgcttccccg	cgttgcgtcg	cgggtgatgg	agccgggcca	cctcgacctg	a	1191

<210> 37
 15 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Oligonucleótido de construcción

ES 2 371 219 T3

<400> 37

aatattatct tatctttata ataatcattc tcgtttacgt tatcattcac tttacatcag 60
agatatacca tgatgtccgg cggtgctttt gcc 93

5

<210> 38

<211> 93

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 38

15

tgattcgtgt attcctgcat aacagccaac ttgtgaaatg ggcacggaaa tccgtgcccc 60
aaaagagaaa ttacgccccg ccctgccact cat 93

<210> 39

<211> 29

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de construcción

25

<400> 39

cattctcgtt tacgttatca ttcacttta 29

<210> 40

30

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Oligonucleótido de construcción

<400> 40

cctgcataac agccaactg tgaaa 25

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión para producir proteína FGF18 que comprende los siguientes elementos ligados de forma operativa:
 - 5 (a) un origen de replicación procariota;
 - (b) un elemento de ADN de inicio de la transcripción;
 - (c) una secuencia polinucleotídica como se muestra en SEC ID N° 3; y
 - (d) un terminador de la transcripción.
2. Un vector de expresión para producir proteína trFGF18 que comprende los siguientes elementos ligados de forma operativa:
 - 10 (a) un origen de replicación procariota;
 - (b) un elemento de ADN de inicio de la transcripción;
 - (c) una secuencia polinucleotídica como se muestra en SEC ID N° 5; y
 - (d) un terminador de la transcripción.
3. El vector de expresión de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende adicionalmente un marcador seleccionable
 - 15 4. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho marcador seleccionable se selecciona del grupo que consiste en resistencia a tetraciclina, resistencia a ampicilina, resistencia a kanamicina, resistencia a neomicina, resistencia a cloranfenicol y el sistema hok/sok.
 5. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la proteína FGF18 o proteína trFGF18 se produce bajo el control del promotor Tac, comprendiendo el vector al menos uno del gen LacI-q, el gen ROP y gen de resistencia a kanamicina y en el que el origen de replicación procariota del vector es C01 E1.
6. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el vector pSDH170 (SEC ID N°: 1).
7. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende el vector pSDH174 (SEC ID N°: 2).
8. Una célula huésped procariota transformada con el vector de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
 - 25 9. La célula huésped procariota de la reivindicación 8 siendo la célula huésped una cepa deficiente en proteasa OmpT de *E. coli*.
 10. La célula huésped de la reivindicación 8 ó 9, siendo la célula huésped una cepa de *E. coli* seleccionada del grupo que consiste en W3110, MM294, TG-1, JM-107, UT5600 y BL21.
- 30 11. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10, siendo dicha célula huésped una cepa de zGOLD1 que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7.
12. Un procedimiento para producir una proteína FGF18 o proteína trFGF18, que comprende:
 - 35 (a) cultivar una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 en medio de crecimiento en condiciones en las que se expresa FGF18 o trFGF18;
 - (b) recuperar las células huésped del medio de crecimiento; y
 - (c) aislar la proteína FGF18 o proteína trFGF18 de las células huésped.
13. Un procedimiento para producir una proteína FGF18 o proteína trFGF18, que comprende:
 - 40 (a) cultivar una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 en un matraz de agitación a DO600 de 5 a 20 en un medio de crecimiento;
 - (b) inocular un recipiente de fermentación con medio de matraz de agitación de 1 a 12 % v/v que contiene células huésped;
 - (c) cultivar las células huésped en un medio de crecimiento a un pH de 6,2 a 7,2, en el que se suministra una solución de suministro al recipiente de fermentación antes de las 15 horas del tiempo de fermentación transcurrido (EFT);
 - 45 (d) añadir un agente inductor al recipiente de fermentación a las 20 a 30 horas EFT; y
 - (e) recoger las células huésped a las 48 a 56 horas EFT.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el agente inductor es isopropil β-D tiogalactopiranosido (IPTG) de 0,5 a 2 mM.
- 50 15. El procedimiento de la reivindicación 13 o reivindicación 14, en el que la solución de suministro comprende un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en glicerol y glucosa a una concentración de medio de crecimiento

y una tasa de suministro de 5-15 gramos de carbohidrato por hora.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el glicerol es glicerol de 40 a 70 % v/v o la glucosa es glucosa de 40 a 70 % p/v.

5 17. Un procedimiento para preparar un sedimento celular o suspensión celular que comprende proteína FGF18 o proteína trFGF18 que comprende:

- 10 (a) sembrar en un matraz un inóculo que comprende (i) una célula huésped *E. coli* W3110 que expresa un polipéptido de FGF18 como se muestra en SEC ID N°: 4 o una célula huésped *E. coli* W3110 que comprende un vector pSDH170 de SEC ID N°: 1, en la que se expresa un polipéptido de FGF18 y comprendiendo el medio de crecimiento glicerol aproximadamente 5 g/l; o (ii) una célula huésped *E. coli* W3110 que expresa un polipéptido de trFGF18 como se muestra en SEC ID N°: 6 o una célula huésped *E. coli* W3110 que comprende un vector pSDH174 de SEC ID N°: 2, en la que se expresa un polipéptido de trFGF18 y comprendiendo el medio de crecimiento glicerol aproximadamente 5 g/l;
- 15 (b) cultivar el inóculo en medio de crecimiento durante 16-20 horas a aproximadamente 30 °C;
- (c) transferir el inóculo cultivado en medio de crecimiento a un fermentador discontinuo a una concentración de inóculo de 0,5-5 % v/v;
- (d) fermentar la fermentación discontinua a aproximadamente 37 °C y aproximadamente pH 6,8; con glicerol aproximadamente 2 %;
- 20 (e) introducir un suministro de glucosa a aproximadamente 8 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT) de aproximadamente 9,5 g de glucosa/litro/hora y continuando hasta final de un ciclo de fermentación;
- (f) añadir IPTG a aproximadamente 24 horas EFT a concentración final de 0,5 a 2 mM;
- (g) fermentar aproximadamente 28 horas después de la adición de IPTG;
- (h) recoger el caldo de fermentación del fermentador;
- 25 (i) añadir un volumen igual de agua al caldo de fermentación; y
- (j) homogeneizar y centrifugar el caldo de fermentación para recoger un sedimento celular o suspensión celular que comprende proteína FGF18 o material proteico de trFGF18.

18. Un procedimiento para aislar proteína FGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 que comprende las etapas de:

- 30 (a) separar material proteico de FGF18 insoluble en agua de un sedimento celular o suspensión celular;
- (b) disolver el material proteico de FGF18 insoluble en un disolvente caotrópico;
- (c) diluir el disolvente caotrópico y replegar la proteína FGF18; y
- (d) aislar la proteína FGF18, en el que la proteína FGF18 aislada es capaz de ser biológicamente activa.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la proteína FGF18 aislada es al menos 90 % pura y tiene un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por mg de proteína FGF18.

35 20. Un procedimiento para aislar proteína trFGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 que comprende las etapas de:

- (a) separar material proteico de trFGF18 insoluble en agua de un sedimento celular o suspensión celular;
- (b) disolver el material proteico de trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico;
- (c) diluir el disolvente caotrópico y replegar la proteína trFGF18; y
- (d) aislar la proteína trFGF18, en el que la proteína trFGF18 aislada es capaz de ser biológicamente activa.

40 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 17, 18 y 20, en el que la proteína FGF18 o trFGF18 aislada es al menos 90 % pura.

22. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la proteína trFGF18 aislada es al menos 90 % pura y tiene un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por mg de proteína trFGF18.

45 23. Un procedimiento para aislar proteína FGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de FGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- 50 (c) disolver el material proteico de FGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina;
- (d) diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento que comprende sales de arginina y una mezcla de componentes reductores y oxidantes;
- (e) aislar la proteína FGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración; y
- 55 (f) purificar la proteína replegada FGF18 en una columna de intercambio catiónico; en el que la proteína FGF18 aislada y purificada es biológicamente activa y es al menos 90 % pura.

24. Un procedimiento para aislar proteína trFGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- 5 (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de trFGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- (c) disolver el material proteico de trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina;
- (d) diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento que comprende sales de arginina y una mezcla de componentes reductores y oxidantes;
- 10 (e) aislar la proteína trFGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración; y
- (f) purificar la proteína replegada trFGF18 en una columna de intercambio catiónico; en el que la proteína trFGF18 aislada y purificada es biológicamente activa y es al menos 90 % pura.

25. Un procedimiento para aislar proteína FGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- 15 (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de FGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- (c) disolver el material proteico de FGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina;
- 20 (d) diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento que comprende sales de arginina y una mezcla de componentes reductores y oxidantes;
- (e) aislar la proteína FGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración;
- (f) purificar la proteína replegada FGF18 en una columna de intercambio catiónico; y
- 25 (g) purificar el eluato de FGF18 de la etapa (f) en una columna de interacción hidrófoba, en el que la proteína FGF18 aislada y purificada es biológicamente activa.

26. Un procedimiento para aislar proteína trFGF18 insoluble producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- 30 (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de trFGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- (c) disolver el material proteico de trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende una sal de guanidina;
- (d) diluir el disolvente caotrópico por adición de un tampón de replegamiento que comprende sales de arginina y una mezcla de componentes reductores y oxidantes;
- 35 (e) aislar la proteína trFGF18 retirando proteínas no plegadas y agregadas por filtración;
- (f) purificar la proteína replegada trFGF18 en una columna de intercambio catiónico; y
- (g) purificar el eluato de trFGF18 de la etapa (f) en una columna de interacción hidrófoba, en el que la proteína trFGF18 aislada y purificada es biológicamente activa.

27. Un procedimiento para aislar proteína FGF18 producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de FGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- 45 (c) disolver la proteína FGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende clorhidrato de guanidina aproximadamente 6 M, ditioneitol 40 mM (DTT) durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente;
- (d) replegar la proteína FGF18 disuelta en una solución diluyendo en tampón de replegamiento que comprende Tris 50 mM, NaCl 120 mM y CuSO₄ 0,5 mM;
- (e) filtrar la solución;
- 50 (f) cargar la solución en columna de resina equilibrada a pH 8,0 usando tampón de acetato sódico;
- (g) lavar la columna de resina con cloruro sódico aproximadamente 0,4 M;
- (h) lavar la columna de resina con cloruro sódico aproximadamente 0,75 M para eluir proteína FGF18 unida;
- (i) añadir sulfato de amonio a una concentración de aproximadamente 1,5 M para eluir y filtrar la solución de eluato;
- 55 (j) cargar el eluato en una columna de resina de cromatografía de interacción hidrófoba equilibrada a sulfato de amino 1,5 M, cloruro sódico 0,05 M en tampón de acetato sódico;
- (k) lavar la columna con sulfato de amonio aproximadamente 1,5 M, cloruro sódico 0,05 M en tampón de acetato sódico;
- (l) diluir el eluato a una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm con agua;
- 60 (m) cargar el eluato en una columna de SP Sepharose® HP equilibrada con tampón de acetato sódico;
- (n) lavar la columna con gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de cloruro sódico de 0,3 a 0,7 M; y

(o) concentrar y aislar la proteína FGF18 a través de intercambio de tampón usando ultrafiltración de flujo tangencial.

28. Un procedimiento para aislar proteína trFGF18 producida por una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende las etapas de:

- 5 (a) separar de un caldo de fermentación un sedimento celular o suspensión celular que comprende material proteico de trFGF18 insoluble en agua;
- (b) homogeneizar el sedimento celular o suspensión celular para recoger cuerpos de inclusión;
- (c) disolver la proteína trFGF18 insoluble en un disolvente caotrópico que comprende clorhidrato de guanidina aproximadamente 6 M, ditioneitol 40 mM (DTT) durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente;
- 10 (d) replegar la proteína trFGF18 disuelta en una solución diluyendo en tampón de replegamiento que comprende Tris 50 mM, NaCl 120 mM y CuSO₄ 0,5 mM;
- (e) filtrar la solución;
- (f) cargar la solución en columna de resina equilibrada a pH 8,0 usando tampón de acetato sódico;
- (g) lavar la columna de resina con cloruro sódico aproximadamente 0,4 M;
- 15 (h) lavar la columna de resina con cloruro sódico aproximadamente 0,75 M para eluir proteína trFGF18 unida;
- (i) añadir sulfato de amonio a una concentración de aproximadamente 1,5 M para eluir y filtrar la solución de eluato;
- (j) cargar el eluato en una columna de resina de cromatografía de interacción hidrófoba equilibrada a sulfato de amino 1,5 M, cloruro sódico 0,05 M en tampón de acetato sódico;
- 20 (k) lavar la columna con sulfato de amonio aproximadamente 1,5 M, cloruro sódico 0,05 M en tampón de acetato sódico;
- (l) diluir el eluato a una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm con agua;
- (m) cargar el eluato en una columna de SP Sepharose® HP equilibrada con tampón de acetato sódico;
- (n) lavar la columna con gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de cloruro sódico de 0,3 a 0,7 M;
- 25 (o) concentrar y aislar la proteína trFGF18 a través de intercambio de tampón usando ultrafiltración de flujo tangencial; y
- (p) intercambiar el tampón a tampón de formulación usando ultrafiltración de flujo tangencial.

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23-28 en el que la sal de guanidina se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de guanidina y tiocianato de guanidina.

30 30. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-26, en el que la actividad biológica se mide usando un ensayo de proliferación celular de FGF18.

31. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende SEC ID N°: 3.

32. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende SEC ID N°: 5.

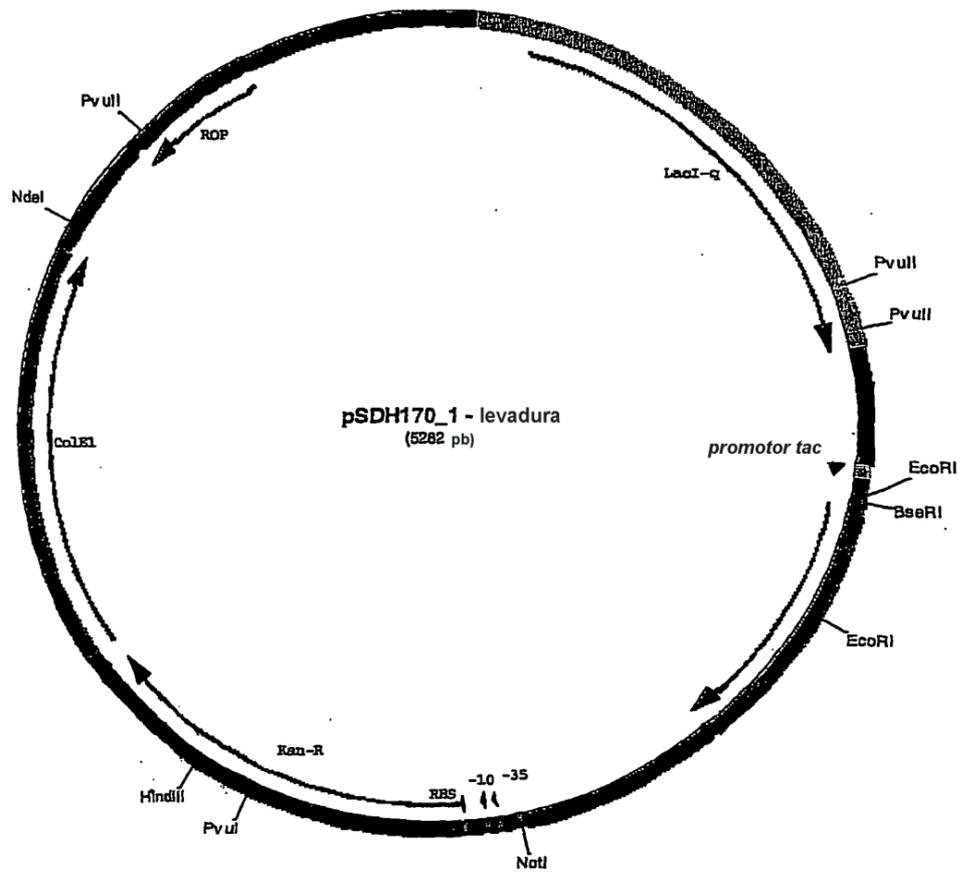


FIG. 1

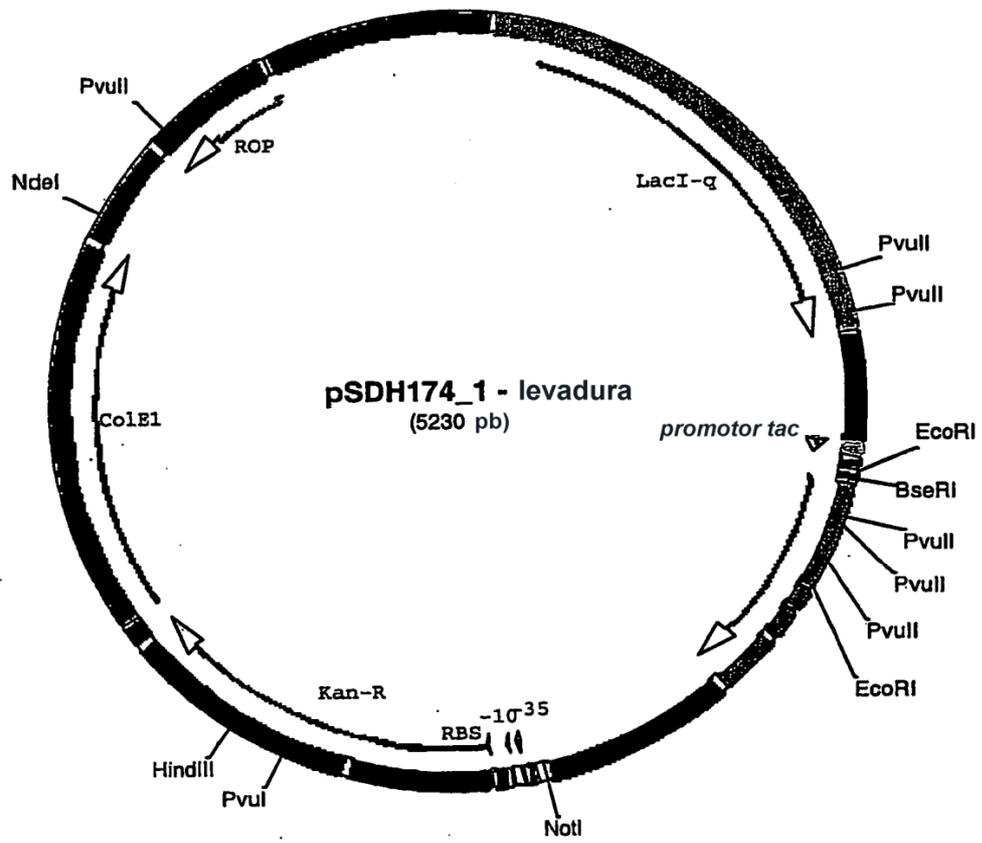


FIG. 2