

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 829**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C07K 1/18** (2006.01)  
**C07K 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06008034 .8**  
96 Fecha de presentación: **08.07.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1714972**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **MÉTODO PARA PRODUCIR UN PÉPTIDO CON UN PI SUPERIOR A 8 O INFERIOR A 5.**

30 Prioridad:  
**10.07.1998 US 92423 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2012**

73 Titular/es:  
**SCIOS, INC.**  
**6500 PASEO PADRE PARKWAY**  
**FREMONT, CA 94555, US**

72 Inventor/es:  
**Pollitt, N. Stephen;**  
**Buckley, Douglas I.;**  
**Stathis, Peter A.;**  
**Hartman, Taymar E. y**  
**Zhong, Ziyang**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 829 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

Método para producir un péptido con un pI superior a 8 o inferior a 5

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos y a reactivos útiles en la producción de péptidos. En particular, la invención se refiere a la producción de péptidos que tienen pIs por debajo de aproximadamente 5 o por encima de aproximadamente 8. Una realización preferida de la invención se refiere a la producción de péptido natriurético de tipo b.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se dirige a métodos eficaces para expresar y recuperar un péptido, particularmente cuando el péptido que se desea producir tiene un alto pI o un bajo pI, lo que hace deseable emplear cromatografía de intercambio iónico (IEC) como etapa en la purificación del péptido. Se pondrán ejemplos de la invención con respecto a péptido natriurético de tipo b, que tiene un pI relativamente alto. No obstante, los expertos en la técnica apreciarán que los métodos y los reactivos descritos aquí tendrán aplicabilidad para la producción de otros péptidos que tengan pI alto o bajo.

15 Es bien sabido en la técnica que la producción de péptidos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud por expresión de ADN que codifica péptido en una célula hospedante recombinante tal como *E. coli* está plagada comúnmente por el problema de la degradación enzimática del péptido expresado dentro de la célula hospedante, produciendo una pérdida parcial o completa del péptido. El medio empleado más comúnmente para superar este problema es insolubilizar el péptido dentro de la célula hospedante. Esto puede efectuarse expresando el péptido como una proteína de fusión en la que el péptido está enlazado a un asociado de fusión. Normalmente, el asociado de fusión  
20 estará fusionado al término N del péptido. La proteína de fusión forma cuerpos de inclusión dentro de la célula, dentro de la cual se protege al péptido de degradación por enzimas proteolíticas.

Una vez recuperados los cuerpos de inclusión de la célula hospedante, debe separarse el péptido de la secuencia líder, purificarse y recuperarse en forma activa. La separación de la secuencia líder puede conseguirse poniendo una secuencia de aminoácidos en la unión de la líder y el péptido, que son reconocidos y divididos específicamente en  
25 condiciones apropiadas, por ejemplo, división por ácido o división enzimática. La división enzimática no es práctica frecuentemente para producción a escala comercial debido al alto coste de la enzima y duración útil limitada, incluso cuando se emplea en una columna inmovilizada.

La división por ácido puede conseguirse poniendo un dipéptido específico en la unión de la secuencia líder y el péptido, en la que el primer aminoácido del dipéptido es ácido aspártico. La selección del segundo aminoácido determinará la  
30 velocidad a la que se divide el enlace dipéptido en condiciones ácidas. Por supuesto, si el péptido deseado contiene algunas secuencias de dipéptido internas que son divisibles por ácido, el lugar de división en la unión de la líder y el péptido debe experimentar división por ácido a una velocidad sustancialmente mayor que la división interna con el fin de evitar pérdidas inaceptables de rendimiento. Las velocidades de reacción relativas de dipéptidos divisibles por ácido son como sigue:

35 <u>Dipéptido</u>	<u>Velocidad de reac. relat.</u>
Asp-Pro*	10x
Asp-X X = Gly*, Ser*, Leu*, Ile, Val	1x
Asp-Lys*	0,5x
Asp-Arg**	0,2x

40 \* F. Marcus, Int. J. Peptide and Protein Res. (1985) 25: 542.546

\*\* Observaciones de los inventores

45 Antes de la división enzimática o por ácido, la proteína de fusión de los cuerpos de inclusión se solubiliza normalmente por tratamiento con un agente caotrópico que causa el despliegue de la estructura de proteína. La proteína de fusión solubilizada se divide después, el péptido deseado se aísla y purifica y el péptido se somete a condiciones que lo hacen replegarse en una conformación activa biológicamente, tal como por separación del caotropo y oxidación, si es necesario para ocasionar la formación de enlaces disulfuro internos.

50 El péptido conocido como péptido natriurético de tipo b o BNP tiene lugar en seres humanos como un péptido de 32 aminoácidos que se produce *in vivo* por la división de una proteína precursora de 134 aminoácidos. Se ha aislado la secuencia de ADN que codifica el precursor natriurético de tipo b (Patente de los EE.UU. N° 5.114.923). Se ha mostrado en pruebas clínicas humanas que el péptido natriurético de tipo b mejora la función del corazón sin estimulación cardíaca directa (que puede causar efectos secundarios dañinos tales como arritmias) y a niveles disminuidos de

neurohormonas asociadas con mortalidad acrecentada y aceleración de la progresión de fallo cardíaco. Por consiguiente, es útil en el tratamiento de pacientes con fallo cardíaco congestivo.

- 5 Aunque el péptido natriurético de tipo b ofrece ciertas ventajas clínicas sobre otros fármacos usados para tratar pacientes con fallo cardíaco congestivo, el coste relativamente alto de producción de fármacos péptidos en comparación con fármacos no péptidos podría presentar un impedimento para su aceptación en la práctica clínica. En consecuencia, hay necesidad de proporcionar un medio altamente eficaz para producir péptido natriurético de tipo b con el fin de minimizar su coste. La producción recombinante del péptido en forma de cuerpos de inclusión presenta varios problemas. El uso de división enzimática de una proteína de fusión para producir péptido natriurético de tipo b es indeseable por el alto coste de las enzimas que se requerirían. Si se desea tomar ventaja del pI relativamente alto de péptido natriurético de tipo b  $\geq$ (10) usando cromatografía de intercambio iónico como etapa de purificación, ha de evitarse el uso de un caotrope iónico tal como hidrocloreuro de guanidina, porque el caotrope iónico interferirá con la cromatografía de intercambio iónico. Por otra parte, la urea, el caotrope no iónico usado más comúnmente, es problemática si se ha de emplear división por ácido de la proteína de fusión. Bajo condiciones ácidas a alta temperatura, la presencia de urea causa la degradación del péptido.
- 10 El documento W092/02550 describe el aumento artificial del pI de una proteína de fusión hasta por encima de 8,0 para facilitar la purificación desde los cuerpos de inclusión usando urea 6M, seguido de cromatografía de intercambio iónico. Tras la división de los asociados de fusión estos se separan en una etapa adicional de purificación por intercambio iónico.
- 15 En el documento US 5.670.340 se hicieron proteínas de fusión comprenden una proteína de interés con un pI muy bajo, mediante lo cual se observó que un pI de la proteína de fusión de entre 4,9-6,9 era óptimo para la expresión en la forma de cuerpos de inclusión.

20 Sumario de la invención

25 En la presente invención, la división por ácido de la proteína de fusión se realiza en ausencia de caotropos, produciendo péptido natriurético de tipo b soluble. El péptido soluble puede separarse del asociado de fusión y otros contaminantes, que permanecen insolubles, usando cualquier método conveniente conocido para separar proteínas solubles de proteínas insolubles, por ejemplo, por ultrafiltración, diafiltración o centrifugación. Puesto que la ultrafiltración y la centrifugación son etapas subóptimas desde un punto de vista comercial, una realización preferida de la invención emplea solubilización de los materiales insolubles, tras la división, por tratamiento con un caotrope no iónico tal como urea, y aislamiento de péptido natriurético de tipo b por cromatografía de intercambio iónico.

30 La presente invención proporciona un método eficaz para producir un péptido que tiene un pI por encima de aproximadamente 8 o por debajo de aproximadamente 5. Una realización preferida del método de la invención comprende las etapas de:

35 (a) expresar dicho péptido en una célula hospedante recombinante como una proteína de fusión, en la que el péptido deseado está fusionado en su término N a un asociado de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un residuo Asp en su término C, en la que (i) el residuo Asp C-terminal del asociado de fusión y el residuo N-terminal del péptido forman un enlace que es divisible en condiciones ácidas, (ii) el péptido tiene una carga neta lo suficientemente diferente de la del asociado de fusión y cualesquiera fragmentos indeseados producidos por división con ácido de la proteína de fusión para que el péptido sea capaz de ser separado del asociado de fusión y cualesquiera fragmentos de división por ácido indeseados de la proteína de fusión por cromatografía de intercambio iónico y (iii) la proteína de fusión forma cuerpos de inclusión dentro de la célula hospedante recombinante;

(b) recuperar los cuerpos de inclusión de la célula hospedante recombinante;

(c) dividir el péptido del asociado de fusión sometiendo la proteína de fusión a condiciones ácidas en ausencia de un caotrope;

45 (d) solubilizar los productos de división insolubles tratándolos con un caotrope no iónico en condiciones que los hacen resultar solubilizados sin degradar la estructura principal del péptido; y

(e) aislar el péptido por cromatografía de intercambio iónico.

Se proporciona también aquí un vector de expresión que es útil para expresar una proteína de fusión que es divisible en condiciones ácidas para producir un péptido deseado que tiene un pI por encima de 8 o por debajo de 5, comprendiendo dicho vector:

50 (a) una secuencia reguladora capaz de dirigir la expresión de la proteína de fusión en la célula hospedante;

(b) una secuencia de ADN que codifica al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) modificada en la que se ha sustituido un número suficiente de codones que codifican residuos de lisina, arginina y/o histidina por codones que codifican aminoácidos sin cargar o cargados negativamente, de modo que el pI de la proteína de fusión está entre 6,0 y 8,0;

(c) un codón que codifica ácido aspártico, que está enlazado al extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica cloranfenicol acetil transferasa modificada, directamente o a través de una secuencia enlazadora; y

5 (d) una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado que tiene un pl superior a 8 o inferior a 5 y que tiene un residuo de prolina, glicina, serina, leucina, alanina, isoleucina o valina en su término N, estando enlazada dicha secuencia en su extremo 5' al extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica la cloranfenicol acetil transferasa modificada.

#### Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una cloranfenicol acetil transferasa modificada usada como asociado de fusión para producir péptido natriurético de tipo b.

10 La Fig. 2 muestra la secuencia de ADN del promotor *phoA* de tipo natural en la línea superior y el promotor *phoA* modificado en la línea inferior.

La Fig. 3 es un diagrama de plásmido de pTH85.

La Fig. 4 es un diagrama de plásmido de pSP54.

La Fig. 5 es un diagrama de plásmido de pCB101-1.

15 La Fig. 6 es un diagrama de plásmido de pTH76.

La Fig. 7 es un diagrama de plásmido de pTH53.

#### Descripción detallada de la invención

##### A. Método de producción de la invención

20 El método de la invención se usa para producir péptidos purificados que tienen pls superiores a aproximadamente 8 o inferiores a aproximadamente 5. Aunque se ejemplifica aquí la invención con respecto a péptido natriurético de tipo b, que tiene un pl relativamente alto, se apreciará que el método de la invención también es aplicable a la producción de péptidos con pls bajos, siempre que el péptido deseado tenga una carga neta suficientemente diferente de la del asociado de fusión y cualesquiera fragmentos indeseados producidos por división con ácido de la proteína de fusión (es decir, fragmentos producidos por división en lugares distintos de la unión del asociado de fusión y el péptido deseado)

25 para permitir aislar el péptido deseado de la mezcla de división por cromatografía de intercambio iónico. La diferencia de carga neta entre el péptido y los otros productos de división, incluyendo cualquier asociado de fusión intacto de la mezcla de división, es preferiblemente al menos aproximadamente  $\pm 2$ , más preferiblemente al menos aproximadamente  $\pm 3$ . Así, si se selecciona un asociado de fusión que tenga uno o más lugares de división por ácido internos, cada uno de los productos de división del asociado de fusión debe tener una carga neta que sea

30 suficientemente diferente de la del péptido deseado para que pueda separarse del péptido por cromatografía de intercambio iónico.

El asociado de fusión se selecciona también considerando la formación de cuerpos de inclusión por la proteína de fusión. La selección de un asociado de fusión apropiado para este propósito dependerá, en parte, de la naturaleza del péptido producido. Preferiblemente, el asociado de fusión contiene al menos 50 residuos de aminoácidos

35 aproximadamente. Aunque no hay un límite superior estricto en el número de residuos de aminoácidos del asociado de fusión, se prefiere que no supere aproximadamente 100, porque un número mayor de residuos de aminoácidos en el asociado de fusión se traduce generalmente en un menor rendimiento del péptido deseado. También se prefiere seleccionar un asociado de fusión de tal modo que la proteína de fusión contenga de alrededor de 25 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos hidrófobos, que promueven la formación de cuerpos de inclusión.

40 El asociado de fusión tiene un residuo Asp en su extremo C-terminal en el que se une al extremo N-terminal del péptido.

Preferiblemente, el asociado de fusión se selecciona de tal modo que el pl de la proteína de fusión esté entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Un asociado de fusión de la invención particularmente preferido contiene al menos una porción N-terminal de una cloranfenicol acetil transferasa modificada. La secuencia de aminoácidos de la cloranfenicol acetil transferasa se modifica para sustituir un número suficiente de residuos de lisina, arginina y/o histidina

45 con aminoácidos no cargados o cargados negativamente para que la proteína de fusión tenga un pl entre 6,0 y 8,0, preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Las modificaciones adicionales que pueden hacerse a la secuencia de cloranfenicol acetil transferasa incluyen: (a) sustitución de los residuos de cisteína, triptófano y metionina por residuos distintos de cisteína, triptófano y metionina; y (b) sustitución de uno o más residuos ácidos o básicos con residuos hidrófobos según se requiera para conseguir el equilibrio de cargas.

50 La sustitución de los residuos de triptófano, cisteína y metionina sirve para eliminar reacciones secundarias oxidativas indeseables que podrían implicar al péptido deseado. La sustitución de residuos hidrófobos por lisina, arginina y/o histidina reduce el pl y el porcentaje de residuos cargados del asociado de fusión e introduce hidrofobicidad que promueve la formación de cuerpos de inclusión. El residuo de Asp en el extremo C-terminal de la secuencia de

cloranfenicol acetil transferasa modificada puede enlazarse a la secuencia de cloranfenicol acetil transferasa directamente o a través de una secuencia enlazadora. Puede estar presente una secuencia enlazadora como resultado de traducción de codones insertados en el vector de expresión para proporcionar un lugar de restricción. Si el péptido que se desea producir por el método de la invención contiene un lugar de división por ácido interno, el lugar de división por ácido formado en la unión del asociado de fusión y el péptido debe ser uno que tenga una velocidad de reacción más alta que el lugar de división interno, como se ha indicado antes. Por ejemplo, el péptido natriurético de tipo b humano contiene un dipéptido de Asp-Arg interno que es susceptible de división por ácido. Según la presente invención, se ha expresado este péptido como una fusión con una secuencia de cloranfenicol acetil transferasa modificada, en la que la unión del asociado de fusión y el péptido natriurético de tipo b forma un dipéptido de Asp-Ser. Debido a las velocidades diferenciales de división por ácido de los dos dipéptidos, se han podido obtener buenos rendimientos del péptido deseado, no obstante la pérdida de algún péptido por división en el lugar de división interno. Alternativamente, se ha utilizado el procedimiento de la invención para producir péptido natriurético de tipo b (2-32). Esta molécula tiene actividad biológica equivalente a la de la forma de 32 aminoácidos de longitud completa y, debido a la presencia de prolina en su término N, produce una división aún más eficaz del asociado de fusión, con aumento concomitante de rendimiento.

La proteína de fusión se expresa en una célula hospedante usando técnicas conocidas de producción de ADN recombinante. Puede emplearse cualquier célula hospedante adecuada de la que se sepa que es útil para la expresión de proteínas por métodos de ADN recombinante, incluyendo células y linajes celulares hospedantes procaríotas y eucariotas. Una célula hospedante preferida es *E. coli*. La célula hospedante contiene un vector de expresión que codifica la proteína de fusión bajo el control de una secuencia reguladora que es capaz de dirigir su expresión en la hospedante, así como un origen de replicación que es funcional en la célula hospedante. El vector puede contener otras secuencias de ADN empleadas convencionalmente en tecnología de ADN recombinante tales como secuencias que codifican marcadores seleccionables.

Se desarrolla la célula hospedante que contiene el vector de expresión y se expresa la proteína de fusión en condiciones apropiadas. Las condiciones para desarrollar la célula hospedante y expresar la proteína de fusión variarán dependiendo de diversos factores tales como la célula hospedante empleada, el promotor y la proteína de fusión particular expresada. Los expertos en la técnica son capaces de determinar las condiciones apropiadas para el sistema de hospedante/vector particular empleado.

Después de expresarse la proteína de fusión en forma de cuerpos de inclusión, se recuperan los cuerpos de inclusión de las células hospedantes. Esto puede conseguirse por métodos conocidos tales como, por ejemplo, lisando las células química o mecánicamente y separando los cuerpos de inclusión por centrifugación. Típicamente, se diluye una pasta de células en varios volúmenes de un tampón de lisis y se lisan las células por paso múltiple a través un homogeneizador AVP-Gaulin a 632,76-703,07 kg/cm<sup>2</sup>. El lisado de células se diluye después adicionalmente en tampón y se centrifuga para recuperar los cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión se someten después a condiciones ácidas para dividir el asociado de fusión del péptido deseado. La división por ácido se realiza en ausencia de un caotropo con el fin de evitar someter el péptido a condiciones que causarían su degradación. La división puede efectuarse suspendiendo los cuerpos de inclusión en una solución acuosa ácida a temperatura elevada. Preferiblemente, los cuerpos de inclusión se suspenden entre el 5% y el 15% p/v, más preferiblemente entre el 5% y el 8% p/v, en una solución de ácido a un pH entre aproximadamente 1,7 y 2,2, preferiblemente entre 1,9 y 2,1. Un ácido preferido para realizar la división es HCl, aunque pueden emplearse otros ácidos, incluyendo a modo de ejemplo ácido acético y ácido fosfórico. La división se realiza a una temperatura suficiente y durante un tiempo suficiente para maximizar el rendimiento. Típicamente, la división se realiza a una temperatura de alrededor de 75°C a aproximadamente 95°C durante un período de alrededor de 2 h a aproximadamente 10 h. En la producción de péptido natriurético de tipo b, se realizó la división por ácido diluyendo los cuerpos de inclusión al 10% p/v en agua, ajustando el pH en 2,0 con HCl y manteniendo a 85°C durante 4,5-5,5 horas, preferiblemente.

Puesto que la ultrafiltración y la precipitación son etapas subóptimas desde un punto de vista de producción comercial, se prefiere que, tras la división, el asociado de fusión y el péptido se solubilizan tratándolos con un caotropo no iónico, preferiblemente urea, y el péptido se aísla después por cromatografía de intercambio iónico. La suspensión se enfría preferiblemente a 50°C o inferior, por ejemplo, por debajo de 40°C, antes de añadir el caotropo. La solubilización puede realizarse añadiendo urea sólida a una concentración de alrededor de 3 M a aproximadamente 7 M y manteniendo a una temperatura inferior a 40°C, preferiblemente a aproximadamente temperatura ambiente (18-25°C).

Después de ajustar el pH entre 3 y 7,5, preferiblemente 3,8-4,2, la solución que contiene el asociado de fusión y el péptido divididos puede cargarse después directamente en una columna de intercambio iónico. Puede emplearse cualquier columna de intercambio iónico disponible comercialmente adecuada para el péptido. Para péptido natriurético de tipo b, se empleó una columna de intercambio iónico de sulfopropilo (Pharmacia Streamline®). La columna se equilibró y lavó para eluir contaminantes. El péptido deseado se eluye después de la columna usando una concentración de sal apropiada. Para péptido natriurético de tipo b, la elución de la columna se efectuó preferiblemente con solución de NaCl 0,5-0,6 M.

En muchos casos, el péptido recuperado de la columna de intercambio iónico se repliega en su conformación nativa, aunque pueden requerirse etapas adicionales para restaurar el péptido a una forma activa biológicamente,

particularmente cuando el péptido requiere para actividad la formación de enlaces disulfuro internos. El péptido natriurético de tipo b contiene dos residuos de cisteína que deben enlazarse por disulfuro. Esto puede conseguirse sometiendo el péptido recuperado a condiciones de oxidación. La oxidación puede efectuarse habitualmente sometiendo una solución del péptido a calor y agitación bajo aire. Alternativamente, pueden emplearse oxidantes tales como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{I}_3^-$  o  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ .

Si se desea, pueden emplearse etapas de purificación adicionales usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Tales etapas pueden incluir, por ejemplo, HPLC, tal como RP-HPLC o etapas de cromatografía de intercambio iónico adicionales. En el caso de péptido natriurético de tipo b, el péptido recuperado se sometió a RP-HPLC (HPLC de fase inversa), en tampón de acetato amónico pH 5,0-5,5 y gradiente de elución de acetonitrilo.

#### 10 B. El vector de expresión de la invención

La presente invención proporciona también un vector de expresión adecuado para realizar el método de producción de la invención. El vector de expresión utiliza una secuencia de ADN que codifica al menos una porción N-terminal de la secuencia de aminoácidos de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que se ha modificado de tal modo que se haya sustituido un número suficiente de codones para residuos de lisina, arginina y/o histidina por codones para aminoácidos sin cargar o cargados negativamente de tal modo que el pI de la proteína de fusión esté entre 6,0 y 8,0, preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Ventajosamente, parte de los residuos de lisina, arginina y/o histidina puede sustituirse con residuos hidrófobos, que no sólo reducen la carga neta del asociado de fusión, sino que promueven también la formación de cuerpos de inclusión dentro de la célula hospedante. Si se desea, pueden sustituirse uno o más codones para residuos de triptófano, cisteína y/o metionina en la secuencia nativa de CAT por codones para residuos distintos de triptófano, cisteína o metionina con el fin de impedir reacciones secundarias oxidativas indeseables, por ejemplo, enlace disulfuro con péptido natriurético de tipo b, siempre que la proteína de fusión resultante tenga un pI en el intervalo requerido.

En la Fig. 1, la secuencia de aminoácidos en la línea superior representa la secuencia de aminoácidos nativa de los primeros 78 aminoácidos del término N de CAT. La línea inferior representa la secuencia de CAT modificada que se codificó por el vector que se usó para expresar una proteína de fusión adecuada para la producción de péptido natriurético de tipo b. Los cinco aminoácidos de la secuencia modificada que comienza con Thr (posición 74) representa una secuencia de enlace que une el Asp C-terminal con la secuencia de CAT modificada y que introduce un lugar de Agel. El lugar de Agel se produjo mutando los codones para los aminoácidos 74 y 75.

En el vector de la invención, la secuencia de ADN que codifica CAT modificada está bajo el control de una secuencia reguladora que es capaz de dirigir la expresión de la proteína de fusión en la célula hospedante. Puede emplearse cualquier promotor adecuado, por ejemplo, un promotor *trpLE*, *phoA* o *lacZ*. Un promotor preferido es el promotor *phoA* de *E. coli* descrito por Wanner, B.L. en *Escherichia coli and Salmonella*, 2ª edición (Neidhardt, P.C. et al. Eds., ASM Press, Washington, D.C.), págs. 1357-1381. Este promotor inicia la transcripción de la proteína de fusión que codifica la secuencia de ADN en ausencia de fosfato en el medio de crecimiento. El promotor *phoA* que puede emplearse se mutó de la secuencia de *phoA* de *E. coli* nativa para sustituir la señal de GTG nativa por una señal de iniciación de la traducción de ATG. La Fig. 2 muestra la secuencia de ADN del promotor *phoA* de tipo natural en la línea superior y el promotor *phoA* modificado empleado por los inventores para producir el vector de expresión para péptido natriurético de tipo b en la línea de abajo.

La secuencia de ADN que codifica el péptido deseado está enlazada en su extremo 5' al codón de Asp en el extremo 3' del asociado de fusión. La secuencia de ADN que codifica el péptido tiene, en su extremo 5', un codón para Pro, Gly, Ser o Leu. El aminoácido particular escogido dependerá en parte de la secuencia del péptido deseado. Si el péptido contiene uno o más lugares de división por ácido internos, el aminoácido N-terminal debe seleccionarse de tal modo que el lugar de división en la unión del asociado de fusión y el péptido se divide a una velocidad mayor que la del lugar de división interno. Si la secuencia nativa del péptido deseado no contiene un codón de Pro, Gly, Ser o Leu en su término N, el ADN que codifica el péptido se modifica sustituyendo un codón por el aminoácido deseado en el extremo 5'. Se apreciará que esto producirá un aminoácido extraño en el término N del péptido tras la división del asociado de fusión, que puede ser aceptable si no interfiere con la actividad biológica. En el caso de péptido natriurético de tipo b, el aminoácido N-terminal es Ser. Este aminoácido es aceptable en la unión con el asociado de fusión, porque el péptido natriurético de tipo b contiene sólo un lugar de división por ácido interno, Asp-Arg, que se divide a una velocidad mucho más baja que Asp-Ser.

El vector de expresión de la invención puede prepararse e incorporarse a una célula hospedante usando técnicas muy conocidas de recombinación de ADN.

Los siguientes ejemplos no limitativos se pretenden para ilustrar adicionalmente la práctica de la invención descrita aquí. El plásmido pCB101-1 (Ejemplo 1) en un hospedante W3113 de *E. coli* se ha depositado en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, con el nº de admisión ATCC 98774. El plásmido pTH76 (Ejemplo 1) en un hospedante W3113 de *E. coli* se ha depositado en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, con el nº de admisión ATCC 98775. El plásmido pTH53 (Ejemplo 2) en un hospedante W3113 de *E. coli* se ha depositado en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, con el nº de admisión ATCC 98776.

**Ejemplo 1**

Síntesis y clonación de un gen que codifica una proteína de fusión a péptido natriurético de tipo b

5 El plásmido resistente a tetraciclina pCB101-1 (5 µg), que codifica el promotor *trp* y una proteína de fusión consistente en el péptido natriurético de tipo b fusionado al extremo 3' de una porción N-terminal de 153 aminoácidos modificada de cloranfenicol acetil transferasa, se digirió con NdeI y AgeI. El digerido resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa del 1% (SeaPlaque, FMC, Rockland, ME) y se cortó el fragmento de 3,4 kpb.

Se sintetizaron oligonucleótidos siguiendo las siguientes secuencias:

Oligo 1099:

TATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGAT (SEQ ID NO:1)

Oligo 1100:

CAGAACATGATATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTT  
CTCCA (SEQ ID NO:2)

Oligo 1101:

ATATCCCAATATCATGTTCTGGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCT  
CAATCAACC (SEQ ID NO:3)

Oligo 1102:

TATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAGAAACCGTAGA  
AGTTAATGTT (SEQ ID NO:4)

Oligo 1103:

AAAGGCCGGATAAAACAGGTGAACATTAACCTTCTACGGTTTCTAAAAAGG  
CCGTAATATC (SEQ ID NO:5)

Oligo 1104:

CAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTTGATTGAGCAACTGACTGAAATGCCT  
CAAAATGTTT (SEQ ID NO:6)

Oligo 1105:

CACCTGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCGTTCTGCTGAATGCTC  
ATCCGCTGTTCA (SEQ ID NO:7)

Oligo 1106:

CCGGTGAACAGCGGATGAGCATTTCAGCAGAACGGCAAGAATGTGAAT  
(SEQ ID NO:8)

10 Se fosforilaron individualmente los oligonucleótidos 1100-1105 (1 µg cada uno) por tratamiento con ATP y quinasa de polinucleótido T<sub>4</sub> y se combinaron con 1 µg cada uno de los oligonucleótidos 1099 y 1106. La mezcla de oligonucleótidos se desnaturalizó después por ebullición durante 7 minutos y se la dejó enfriarse gradualmente a temperatura ambiente. Cinco µl de estos 214 µl de mezcla de reacción se ligaron con 1,5 µl del fragmento cortado fundido de pCB101-1 preparado antes usando ligasa de ADN T<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se re-fundió después y se usó para transformar la cepa MC1061 de *E. coli* a resistencia a tetraciclina. Se examinaron plásmidos que tenían un fragmento de AgeI/MluI de 317 pb en ocho de las colonias resultantes. Un plásmido tal se denominó pTH80, que codifica una secuencia de CAT modificada fusionada a natriurético de tipo b bajo el control de *trp*.

15

Es importante ser capaces de controlar la síntesis de la proteína de fusión durante la fermentación. El promotor *phoA* tiene la ventaja de ser capaz de mantener el gen objetivo en estado no inducido hasta conseguir la inducción total por agotamiento de PO<sub>4</sub>. Para poner la fusión bajo el control del promotor *phoA*, se digirió pTH80 con enzimas de restricción NdeI y HindIII. Se sometió después el digerido a electroforesis en un gel de agarosa del 3% (NuSieve, FMC, Rockland, ME) y se cortó el fragmento de 332 pb que codificaba la fusión CAT-BNP. El fragmento de vector se preparó por digestión del plásmido de resistencia a tetraciclina, pTH76, con NdeI y HindIII. El pTH76 es muy similar al pTH80 excepto que se sustituyó el promotor *trp* por el promotor *phoA*. El fragmento de vector se aisló por digestión de 2,4 µg de pTH76 con NdeI y HindIII a 37°C durante la noche seguido por tratamiento con fosfatasa intestinal de becerro a 37°C durante una hora. El volumen final de la mezcla de reacción fue 100 µl. Se realizó una ligación entre 1 µl del fragmento de vector y 3 µl de una rebanada de gel cortada fundida que contenía el fragmento de inserto de pTH80. Tras incubación durante la noche a temperatura ambiente, se usó la mezcla para transformar la cepa W3110. Se examinó la presencia de un lugar de BstXI único en el ADN preparado de las colonias resultantes. Se confirmaron tres clones positivos por determinación de secuencia de ADN. Uno de éstos se denominó pTH85. La Fig. 3 es un diagrama de plásmido de pTH785.

El plásmido pTH785 y otros dos clones positivos de su construcción se usaron para transformar cepa W3110 de *E. coli* a resistencia a tetraciclina. Se inocularon colonias simples en caldo L con 6,25 µg/ml de tetraciclina. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se usó el cultivo resultante para inocular un cultivo que contenía los siguientes medios a una densidad óptica de 0,1:

Glucosa	4 g
Casaminoácidos	5 g
Tampón de MOPS potásico 1 M, pH 7,4	40 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,24 g
MgSO <sub>4</sub> 1 M	2 ml

Agua hasta un volumen final de 1 litro

Después de incubar durante la noche a 37°C, podían observarse que todas las células bajo microscopía de contraste de fase tenían al menos un cuerpo de inclusión brillante de fase. Las células se recuperan e hirvieron durante 18 minutos en tampón de muestra de SDS y se sometieron a electroforesis en un gel de Tris-glicina SDS poliacrilamida de Laemmli estándar. La acumulación abundante de la proteína de fusión de péptido natriurético b se indica por la presencia de una banda de coloración Coomassie fuerte a aproximadamente 12 kdaltons.

### 30 Ejemplo 2

#### Clonación de un gen que codifica una proteína de fusión a péptido natriurético de tipo b (2-32)

La división por ácido tiene lugar más rápidamente en un enlace de péptido Asp-Pro. Puesto que el segundo residuo de péptido natriurético de tipo b maduro es Pro, es posible facilitar la división del péptido natriurético de tipo b del asociado de fusión expresando una versión truncada de péptido natriurético de tipo b que comprende los residuos de aminoácidos 2-32 [péptido natriurético de tipo b (2-32)]. Una forma alterada del fragmento de restricción de AgeI/HindIII que carecía del codón de serina inicial del péptido natriurético de tipo b maduro se construyó por PCR de la secuencia de codificación de tipo natural usando los siguientes dos oligonucleótidos como cebadores de PCR:

#### Oligo 754:

GTGGTGGTACCGGTGGTGACCCGAAAATGGTTCAG (SEQ ID NO.:9)

#### Oligo PR1279:

CCTACTCTCGCATGGGGAGA (SEQ ID NO:10)

Se preparó una mezcla de reacción de 100 µl que contenía 0,4 mM de cada dNTP, 1,3 µg de cada cebador, 50 ng de plásmido pTH53 que llevaba la secuencia de péptido natriurético de tipo b fusionada en el extremo 3' a un clon de ubiquitina humana y 1 µl de polimerasa de ADN VENT (New England Biolabs, Beverly, MA) en un tampón de reacción proporcionado por el fabricante. La reacción se efectuó durante 30 ciclos del siguiente programa de temperaturas: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 1 minuto. El tamaño anticipado, 167 pb, se verificó por electroforesis en gel de agarosa sobre 3% de Nusieve. El producto de reacción PCR, junto con el plásmido vector pTH53, se sometieron después a doble digestión con KpnI y HindIII. El digerido del vector se trató adicionalmente con fosfatasa intestinal de becerro durante 45 minutos a 37°C seguido por extracción con fenol y precipitación con etanol. El digerido del plásmido se resuspendió después en 30 µl de tampón de Tris-EDTA. El digerido de PCR se sometió a

electroforesis sobre 3% de Nusieve y se recuperó el fragmento de 108 pb por interceptación de la banda migrante con papel DE81. La ligación del vector y fragmentos digeridos de PCR se realizó en una mezcla de reacción de 20  $\mu$ l consistente en 0,5  $\mu$ l de ADN de vector, 0,1  $\mu$ l de fragmento de PCR y 0,5  $\mu$ l de ligasa de ADN T<sub>4</sub> (New England Biolabs, Beverly, MA) en el tampón suministrado por el fabricante. La ligación se efectuó a temperatura ambiente durante 3 horas seguida por transformación en *E. coli* B competente con CaCl<sub>2</sub>. Se preparó ADN de plásmido a partir de dos de los transformantes resultantes y se usó determinación de secuencia didesoxi para determinar que se había obtenido la secuencia de nucleótidos correcta. Este plásmido se denominó pUDBNP2 y codifica ubiquitina humana fusionada en marco a péptido natriurético de tipo b (2-32).

Para la construcción de un plásmido de expresión que exprese una fusión génica de CAT154 a péptido natriurético de tipo b (2-32), se usó plásmido pUDBNP2 como fuente de la secuencia de codificación del péptido natriurético de tipo b (2-32), mientras que el plásmido pCB101-1 codifica el asociado de fusión CAT154 y se usará como receptor del fragmento de péptido natriurético de tipo b (2-32). Cinco microgramos de pUDBNP2 y 1  $\mu$ g de pCB101-1 se digirieron cada uno con Agel en el tampón suministrado por el fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 2 horas a 37°C. Se comprobó en los digeridos que se había completado por electroforesis en el gel de agarosa. Se recuperó ADN de la mezcla de digestión usando GeneClean (Bio101, CA) y se eluyó en un volumen final de 15  $\mu$ l. Ambos plásmidos se digirieron después con BamHI en el tampón suministrado por el fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 1,5 horas a 37°C. La electroforesis en gel de agarosa mostró que la digestión de pUDBNP2 era incompleta, por tanto, se recuperó el ADN parcialmente digerido usando Gene Clean y se redigirió con BamHI como antes. En este punto, la electroforesis en gel de agarosa mostró que ambos digeridos de pUDBNP2 y pCB101-1 eran completos. Se prepararon fragmentos para ligación por electroforesis sobre 3% de Nusieve cortando la banda de 2407 pb del digerido de pUDBNP2 y la banda de 1562 pb del digerido de pCB101-1. Se recuperaron fragmentos de ADN usando GeneClean y se eluyeron en un volumen final de 10  $\mu$ l. La ligación de los dos fragmentos se consiguió usando 2  $\mu$ l del fragmento de ADN de pUDBNP2 y 5  $\mu$ l del fragmento de ADN de pCB101-1 en una mezcla con 1  $\mu$ l de ligasa de ADN T<sub>4</sub> (New England Biolabs, Beverly, MA) en el tampón suministrado por el fabricante a 15°C durante la noche. La mezcla resultante se transformó en *E. coli* W3110 competente con CaCl<sub>2</sub>. El ADN de plásmido preparado a partir de seis de los transformantes resultantes se digirió con BglI y se identificaron plásmidos que tenían la estructura correcta en base a la presencia de fragmentos de 2845 pb y 890 pb. Una banda de 234 pb esperada procedente de la región de resistencia a tetraciclina es demasiado pequeña para ser visualizada. Además, se inocularon también cultivos usados para preparación de ADN de plásmido en pequeños cultivos LB y se incubaron durante la noche a 37°C. Las células resultantes se visualizaron por microscopía de contraste de fases mientras otras partes alícuotas se hirvieron en tampón de muestra de SDS y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. De las seis colonias tratadas de esta forma, las tres que dieron el modelo de restricción correcto mostraron también la presencia de cuerpos de inclusión brillantes de fase en microscopio y la presencia de una banda de coloración de Coomassie fuerte a aproximadamente 20.500 daltons en SDS-PAGE. Este plásmido se denominó pSP54. La Fig. 4 es un digrama de plásmido de pSP54.

### Ejemplo 3

#### Producción y aislamiento de péptido natriurético de tipo b (1-32)

##### (a) Fermentación y lisis de células

Se fermentaron en modo de alimentación discontinua células de *E. coli* que albergaban el vector de expresión (pTH 85/TEH 102) de péptido natriurético de tipo b (1-32). La inducción de la expresión de proteína de fusión en este sistema se ocasiona permitiendo a las células agotar el fosfato del medio. Se cosecharon al final de las fermentaciones cuarenta y tres litros de caldo de fermentación completo. La biomasa resultante se recogió por centrifugación de caldo de fermentación completo en botellas de 1 l y se guardó a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ . La producción de biomasa de 43 litros de fermentación fue 4,7 kg de peso húmedo de células de *E. coli*. La biomasa congelada se descongeló durante la noche a temperatura ambiente y se diluyó hasta 25% p/v usando tampón de lisis (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 5 mM, pH 6,0). Se homogeneizaron las células usando un homogeneizador Maton-Gaulin Modelo 30CD (632,8-703,1 kg/cm<sup>2</sup>) con un intercambiador de calor refrigerado en línea. La solución de células se enfrió a 2°C antes de iniciar la lisis y se mantuvo la temperatura por debajo de 15°C durante toda la lisis. El flujo a través del homogeneizador se encaminó de vuelta a la solución de células para permitir una media de 6 pasadas a través del homogeneizador para conseguir el punto final de homogeneización de > 90% de lisis como se apreció por examen microscópico.

##### (b) Recuperación de cuerpo de inclusión por centrifugación discontinua

La centrifugación discontinua se realizó en botellas de polipropileno de 1 l usando una centrífuga Sorvall RC-3B refrigerada con rotor H6000. El lisado de células de *E. coli* se diluyó con tampón de lisis hasta 12,5% de peso de células de partida y se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC-3B equipada con un rotor H6000A a 4.500 rpm (5894 g) durante 40 minutos. Se decantó el sobrenadante y el glóbulo de cuerpo de inclusión (905 g) se guardó a 2-8°C.

##### (c) Reacción de división por ácido

Las mezclas de reacción de división por ácido se prepararon a partir de la preparación de cuerpos de inclusión descrita antes. Los cuerpos de inclusión se retiraron del almacenamiento a 2-8°C y se resuspendieron usando un homogeneizador de mano hasta 1980 ml (100 g de cuerpos de inclusión/220 ml) con agua desionizada. Se elaboró

adicionalmente una parte alícuota de esta suspensión equivalente a 100 g de peso húmedo. La preparación de cuerpos de inclusión se diluyó con 780 ml de agua desionizada para producir una suspensión del 10% de peso húmedo. Se ajustó el pH de la suspensión de cuerpos de inclusión con ácido clorhídrico concentrado (~4 ml) en 1,99. Se requirió agitación vigorosa a medida que la solución espesaba entre pH 4,5 y 3,0.

5 La suspensión de cuerpos de inclusión descrita antes se puso en un recipiente de reacción revestido de vidrio de temperatura controlada equipado con agitación, abertura de muestras y conexiones para proporcionar una atmósfera de gas inerte. Se permitió fluir gas inerte al recipiente de reacción a 0,35 kg/cm<sup>2</sup> con la ventilación abierta. Se encendió el controlador de temperatura y se ajustó en la regulación apropiada. La medición del tiempo de reacción comenzó en este punto. Se permitió proceder el calentamiento a 40°C, en cuyo momento se cerró la ventilación y se permitió presurizar el  
10 recipiente de reacción a 0,35 kg/cm<sup>2</sup>. El recipiente de reacción se ventiló ocasionalmente durante el período de ajuste de temperatura para mantener esta presión de cabeza. La mezcla de reacción estuvo dentro de 5°C de la temperatura deseada en 15 minutos. La temperatura se controló en 85 ± 0,5°C durante todo el período de reacción. Se tomaron muestras a intervalos regulares (1 hora y 30 minutos) para análisis RP-HPLC de liberación de péptido natriurético de tipo b. El muestreo se realizó cerrando primero la válvula de entrada de gas, ventilando después el recipiente a presión atmosférica y retirando finalmente una muestra de 1 ml por la abertura de muestras con una jeringa desechable. La  
15 abertura de muestras se cerró después, se volvió a abrir la válvula de entrada de gas, se dejó ventilarse el recipiente durante 5-10 segundos y se cerró finalmente la ventilación para permitir represurizarse el recipiente.

Se terminó la reacción después de 4,5 horas por enfriamiento a 2-8°C en hielo. La solución se agitó continuamente durante el enfriamiento. La reducción de temperatura a < 40°C en < 20 minutos. Al final del período de enfriamiento, se  
20 ajustó el pH de la mezcla de reacción en 2,9 con NaOH 2 N. El contenido de péptido natriurético de tipo b de esta solución se determinó por área de pico de RP-HPLC como 1,92 g de péptido natriurético de tipo b/l. Esta solución se congeló a -70 ± 10°C hasta tratamiento adicional.

(d) Purificación de IEC de péptido natriurético de tipo b (1-32) de la mezcla de reacción de división por ácido

Para purificación de IEC de péptido natriurético de tipo b (1-32), se combinaron cuatro mezclas de reacción de división por ácido, preparadas como se ha descrito antes, y se añadieron 260 g de urea sólida a 1 l de mezcla de reacción de división por ácido para dar una concentración de urea 3,5 M. El volumen final fue 1,3 l. Esta solución contenía 0,6 mg de péptido natriurético de tipo b/ml o 780 mg de péptido natriurético de tipo b. La solución se cargó en una columna rellena de Whatman Express-Ion Exchanger S (resina de intercambio iónico de sulfoxetilo) a razón de 8 mg de hBNP/ml de  
30 resina, en base al ensayo de RP-HPLC. La columna se lavó secuencialmente con 200 ml de urea 3,5 M, ácido acético 50 mM pH 3,5, 500 ml de ácido acético 50 mM, 600 ml de ditiotreitol (DTT) 10 mM, fosfato sódico 50 mM pH 7,2 y finalmente con 1 l de NaCl 55 mM en fosfato sódico 50 mM pH 6,8. La elución del péptido natriurético de tipo b totalmente reducido ahora de la columna se realizó con un gradiente de etapas de 1 l de NaCl 500 mM en fosfato sódico 50 mM pH 6,8. Se recogió el pico de elución de 150 ml y se analizó el contenido de péptido natriurético de tipo b (590 mg total). El agrupamiento de elución se guardó a -70 ± 10°C hasta elaboración adicional.

(e) Formación de enlace disulfuro

Se descongelaron 145 ml del eluyente de la columna de intercambio iónico durante la noche a 4°C y se dejó después calentarse a temperatura ambiente. La solución se diluyó con fosfato sódico 50 mM pH 6,8 a 1,4 mg de péptido natriurético de tipo b/ml. La formación de enlace disulfuro se consiguió por oxidación con aire a 35°C durante 6 horas con agitación moderada. La reacción se terminó por acidificación a pH 5,0 por adición de ácido acético 5 M. El  
40 agrupamiento de oxidación se guardó a -70 ± 10°C hasta elaboración adicional.

(f) Purificación por HPLC de fase inversa de péptido natriurético de tipo b

Los agrupamientos de oxidación de dos reacciones de oxidación realizadas como se ha descrito antes se descongelaron a 2-8°C durante la noche y se dejaron calentarse a temperatura ambiente. Se ajustó el pH en 5,5 con hidróxido amónico 5 N. Esta solución (869 mg de péptido natriurético de tipo b en 756 ml) se cargó a 10,6 ml/min en RP-HPLC preparativa (Zorbax Pro 10/150 C8) con mezclado de disolvente (Carga: Tampón B 85:15) para obtener 6% de acetonitrilo en la carga. La carga de resina fue 9,8 mg/ml de resina. La elución se realizó con el mismo caudal según la tabla indicada después. El Tampón A es agua purificada, el Tampón B es acetonitrilo al 40%, el Tampón C es acetato amónico 1 M pH 5,5.

Etapa	Volumen (ml)	Carga %	Tampón A %	Tampón B %	Tampón C %
Carga	890	85		15	
Lavado	353		60	15	25
Inicio de gradiente			60	15	25

Etapa	Volumen (ml)	Carga %	Tampón A %	Tampón B %	Tampón C %
Fin de gradiente	441		35	40	25
Guardado	177		35	40	25

Se analizaron fracciones del pico de elución por RP-HPLC analítica y se agruparon fracciones de > 96% de pureza. El agrupamiento de RP-HPLC contenía 406 mg de péptido natriurético de tipo b (1-32).

(g) Caracterización de péptido natriurético de tipo b (1-32) de reacción de división por ácido

- 5 El pico principal de RP-HPLC de una preparación similar de péptido natriurético de tipo b después de división por ácido, cromatografía IEC y RP-HPLC se caracterizó por determinación de secuencia de aminoácidos N-terminal completa, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de electropulverización. En todos los aspectos, el péptido producido por este procedimiento era indistinguible de péptido natriurético de tipo b sintético estándar.

**Ejemplo 4**

10 Purificación de péptido natriurético de tipo b (1-32) a partir de mezcla de reacción de división por ácido por ultrafiltración/diafiltración

Como alternativa a la solubilización de la mezcla de reacción de división por ácido para cromatografía, el péptido natriurético de tipo b soluble puede aislarse de la mezcla de reacción de división por ácido cruda mediante diafiltración. El péptido natriurético de tipo b reducido pasa a través del filtro y se retienen los agregados de mayor peso molecular y material insoluble. El péptido natriurético de tipo b pasa libremente a través de la membrana y se encuentra en el filtrado.

Un filtro Filtron ultrasette con corte de peso molecular nominal de 300 kD (Filtron, Cat OS100C72) se puso en modo de diafiltración según la instrucción del fabricante. El dispositivo se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se equilibró después con acetato sódico 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 4,0.

20 Se preparó como se ha descrito antes un litro de mezcla de reacción de división por ácido. Esta solución contenía 705 mg de péptido natriurético de tipo b reducido, determinado por área de pico de RP-HPLC (RT 112/123, 1/26/96). Esta solución se puso en una botella Pyrex de 2 l y se añadieron 60 ml de cloruro sódico 5 M. La mezcla se agitó en hielo durante 25 minutos y se añadieron después 60 ml de agua destilada y 100 ml de acetato sódico 0,2 M, pH 4,0. Se continuó la agitación durante otros 20 minutos en hielo. Se hizo circular después la mezcla a través del dispositivo de diafiltración usando una bomba peristáltica con el caudal de circulación mantenido en 2 l/min. La salida del filtrado se cerró completamente al inicio de la circulación. Después de aproximadamente dos minutos de circulación, la salida del filtrado se abrió lentamente y se controló el caudal de filtrado en un caudal medio de 53,5 ml/min (intervalo 25-82 ml/min). Se añadió a la botella de 2 l tampón de diafiltración, acetato sódico 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 4,0, con el mismo caudal con que se separaba el filtrado del filtro con el fin de mantener la solución de diafiltración en volumen constante. Con estos ajustes, la presión transmembrana se mantuvo en < 0,7 kg/cm<sup>2</sup> durante todo el procedimiento de diafiltración completo. Después de recoger un total de 5.700 ml de filtrado, se detuvo la adición de diluyente a la solución de diafiltración. Se recogió 1 l de filtrado adicional antes de completar el procedimiento de diafiltración. Al final del procedimiento de diafiltración se había recogido un volumen total de 6,7 l de filtrado. La cuantificación de péptido natriurético de tipo b en el filtrado por RP-HPLC mostró una recuperación de 550 mg de péptido natriurético de tipo b o 78%.

**Ejemplo 5**

Producción y aislamiento de péptido natriurético de tipo b (2-32)

(a) Fermentación y lisis de células

40 Se fermentaron en modo de alimentación discontinua células de *E. coli* que albergaban el vector de expresión pSP54 de péptido natriurético de tipo b (2-32). Este sistema usa el promotor *trp* y la expresión de la proteína de fusión se induce por adición de ácido indolacrílico. Se cosechó al final de la fermentación caldo de fermentación completo (4,7 litros). La biomasa resultante se recogió por centrifugación de caldo de fermentación completo en botellas de 1 l y se guardó a -70 ± 10°C. La producción de biomasa de 4,7 litros de fermentación fue 432 g de peso húmedo de células de *E. coli*. La biomasa congelada se descongeló durante la noche a temperatura ambiente y se diluyó hasta 25% p/v usando tampón de rotura (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 5 mM, pH 6,0). Se homogeneizaron las células usando un homogeneizador AVP Gaulin Modelo 30CD (632,8-703,1 kg/cm<sup>2</sup>) con un intercambiador de calor refrigerado en línea. La solución de células se enfrió a 2°C antes de iniciar la rotura y se mantuvo la temperatura por debajo de 15°C durante toda la lisis. El flujo a través del homogeneizador se encaminó de vuelta a la solución de células para permitir una media de 4 pasadas a

través del homogeneizador para conseguir el punto final de homogeneización de > 90% de rotura como se apreció por examen microscópico.

(b) Recuperación de cuerpo de inclusión por centrifugación discontinua

5 La centrifugación discontinua se realizó en botellas de polipropileno de 1 l usando una centrífuga Sorvall RC-3B refrigerada con rotor H6000. El lisado de células de *E. coli* se diluyó con tampón de lisis hasta 12,5% de peso de células de partida y se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC-3B equipada con un rotor H6000A a 4.500 rpm (5894 g) durante 40 minutos. Se decantó el sobrenadante y el glóbulo de cuerpo de inclusión (111,5 g) se guardó a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ .

(c) Reacción de división por ácido

10 La mezcla de reacción de división por ácido se preparó a partir de las preparaciones de cuerpos de inclusión descritas antes. Se retiraron cuerpos de inclusión (55,8 g) del almacenamiento a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$  y se resuspendieron usando un homogeneizador de mano hasta 558 ml con agua desionizada para producir una suspensión del 10% en peso húmedo. Se ajustó el pH de la suspensión de cuerpos de inclusión con ácido clorhídrico 1 M (~28 ml) en 2,0. Se requirió agitación vigorosa a medida que la solución espesaba entre pH 4,5 y 3,0.

15 La preparación de cuerpos de inclusión se puso en un recipiente de reacción revestido de vidrio de temperatura controlada equipado con agitación, abertura de muestras y conexiones para proporcionar una atmósfera de gas inerte. Se permitió fluir gas inerte (Ar) al recipiente de reacción a  $0,35 \text{ kg/cm}^2$  con la ventilación abierta. Se encendió el controlador de temperatura y se ajustó en la regulación apropiada. La medición del tiempo de reacción comenzó en este punto. Se permitió proceder el calentamiento a  $40^\circ\text{C}$ , en cuyo momento se cerró la ventilación y se permitió presurizar el recipiente de reacción a  $0,35 \text{ kg/cm}^2$ . El recipiente de reacción se ventiló ocasionalmente durante el período de ajuste  
20 de temperatura para mantener esta presión de cabeza. La mezcla de reacción estuvo dentro de  $5^\circ\text{C}$  de la temperatura deseada en 15 minutos. La temperatura se controló en  $85 \pm 1,5^\circ\text{C}$  durante todo el período de reacción. Se tomaron muestras a intervalos regulares (30 minutos) para análisis RP-HPLC de liberación de péptido natriurético de tipo b (2-32). El muestreo se realizó cerrando primero la válvula de entrada de gas, ventilando después el recipiente a presión atmosférica y retirando finalmente una muestra de 1 ml por la abertura de muestras con una jeringa desechable. La  
25 abertura de muestras se cerró después, se volvió a abrir la válvula de entrada de gas, se dejó ventilarse el recipiente durante 5-10 segundos y se cerró finalmente la ventilación para permitir represurizarse el recipiente.

Se terminó la reacción después de 2,0 horas por enfriamiento a  $20^\circ\text{C}$  en hielo. La solución se agitó continuamente durante el enfriamiento. Al final del período de enfriamiento, se añadieron a la mezcla de reacción 28 ml de ácido fosfórico 1 M (final 50 mM) y se ajustó el pH de la mezcla de reacción en 2,8 con NaOH 10 N. El contenido de péptido natriurético de tipo b (2-32) de esta solución se determinó por ensayo de RP-HPLC como 0,45 g de péptido natriurético de tipo b reducido (2-32)/l (223 mg de péptido natriurético de tipo b reducido total (2-32)). Esta solución se congeló a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$  hasta tratamiento adicional.  
30

(d) Purificación de intercambio iónico discontinua de péptido natriurético de tipo b (2-32) de la mezcla de reacción de división por ácido

35 Se adsorbió péptido natriurético de tipo b (2-32) de la mezcla de reacción de división por ácido con pH ajustado por incubación discontinua con resina de intercambio catiónico SP-Spherodex LS. Se descongelaron 500 ml de la mezcla de reacción de división por ácido descrita antes en un baño de agua caliente durante 1,5 horas, hasta que la temperatura alcanzó  $22^\circ\text{C}$ . Se añadió resina SP-Spherodex LS (50 ml), lavada según las instrucciones del fabricante, a la mezcla de reacción descongelada en un recipiente de vidrio con agitación moderada. Se agitó la mezcla durante 90 minutos a temperatura ambiente y se tomaron muestras del sobrenadante a intervalos de 30 minutos. Se dejó sedimentar la resina al final del mezclado durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lavó tres veces la resina con 250 ml de ácido acético 50 mM. Se rellenó después una columna (2,5 x 11,5 cm) con la resina y se lavó adicionalmente con 2 volúmenes de columna (CV) de ácido acético 50 mM pH 3,5 a razón de 8 ml/min. Se lavó después la columna con 4 CV de fosfato sódico 50 mM pH 7,2. Se realizó reducción en columna lavando la columna con 4 CV de ditiotreitól (DTT) 10 mM, fosfato sódico 50 mM pH 7,2. Finalmente, se lavó la columna con 4 CV de fosfato sódico 50 mM pH 7,2 seguido por 5 CV de fosfato sódico 50 mM pH 7,2 que contenía NaCl 200 mM. La elución del péptido natriurético de tipo b (2-32) totalmente reducido ahora de la columna se realizó en dos etapas con NaCl 450 mM y 1 M en fosfato sódico 50 mM pH 7,2. El agrupamiento de elución de 330 ml se recogió y analizó en él el contenido de péptido natriurético de tipo b (2-32) (total 148 mg, rendimiento 66%). El agrupamiento de elución procedió directamente a formación de enlace disulfuro..  
40  
45

(e) Formación de enlace disulfuro de péptido natriurético de tipo b (2-32)

Se ajustaron en pH 6,8 con HCl 2 N los 330 ml de eluyente de la columna de intercambio iónico que contenían 0,45 mg de péptido natriurético de tipo b (2-32)/ml. La formación de enlace disulfuro se consiguió por adición de 11 ml de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  15 mM a la solución bajo argón a  $2-8^\circ\text{C}$  durante 11 horas. La reacción se terminó por acidificación a pH 5,0 por adición de 3,4 ml de ácido acético 5 M. El rendimiento de la reacción de oxidación fue 121 mg de péptido natriurético de tipo b (2-32), un rendimiento de etapa del 82%. El agrupamiento de oxidación se guardó a  $2-8^\circ\text{C}$  durante la noche.  
50  
55

(f) Purificación por HPLC de fase inversa de péptido natriurético de tipo b (2-32)

5 El agrupamiento de oxidación se dejó calentarse a temperatura ambiente y se purificó adicionalmente por RP-HPLC. Se añadió acetonitrilo (18 ml) a 342 ml de agrupamiento de oxidación para dar 360 ml de carga. Se ajustó el pH en 5,5 con hidróxido amónico 10 N. Esta solución (160 ml que contenían 51 mg de péptido natriurético de tipo b (2-32)) se cargó a 4,5 ml/min en la columna de RP-HPLC (Vydac C4214TP1010). La carga de resina fue 3 mg/ml. La elución se realizó con el mismo caudal según la tabla indicada después. El Tampón A es acetonitrilo al 5%, acetato amónico 50 mM pH 5,0, el Tampón B es acetonitrilo al 50%, acetato amónico 50 mM pH 5,0.

Etapa	Volumen (ml)	Carga %	Tampón A %	Tampón B %
Carga	160	100		
Lavado	67,5		100	
Inicio de gradiente			100	
Fin de gradiente	180		60	40

10 Se recogieron manualmente fracciones del pico de elución, se analizaron por RP-HPLC analítica y se guardaron a 2-8°C durante 3 días antes de agrupar. Se agruparon las fracciones de pureza > 95% para dar un agrupamiento final de > 97% de pureza por RP-HPLC analítica y una producción de 48 mg de péptido natriurético de tipo b (2-32) o un rendimiento de etapa del 94%.

(g) Caracterización de péptido natriurético de tipo b (2-32) de la reacción de división por ácido

15 El pico principal de RP-HPLC de una preparación similar de péptido natriurético de tipo b después de división por ácido, cromatografía IEC y RP-HPLC se caracterizó por determinación de secuencia de aminoácidos N-terminal completa, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de electropulverización. Los resultados de los tres ensayos indicaron que el péptido producido por este procedimiento era péptido natriurético de tipo b (2-32).

## REIVINDICACIONES

1. Un vector para la expresión en una célula hospedante de una proteína de fusión que es divisible en condiciones ácidas para producir un péptido deseado que tiene un *pI* por encima de 8 o por debajo de 5, comprendiendo dicho vector:

5 (a) una secuencia de ADN que codifica un asociado de proteína de fusión con una carga neta tal que el *pI* de la proteína de fusión está entre 6,0 y 8,0;

(b) un codón que codifica ácido aspártico, que está enlazado al extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica el asociado de la proteína de fusión de (a);

10 (c) una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado que tiene un *pI* superior a 8 o inferior a 5 y que tiene un residuo de prolina, glicina, serina, leucina, alanina, isoleucina o valina en su término N, estando enlazada dicha secuencia de ADN en su extremo 5' al extremo 3' del codón que codifica ácido aspártico de la parte (b); y

(d) una secuencia reguladora capaz de dirigir la expresión de la proteína de fusión en la célula hospedante que está enlazada operativamente a la secuencia de ADN que codifica el asociado de la proteína de fusión,

15 donde la diferencia de carga neta entre el péptido deseado y el asociado de fusión y cualesquiera otros fragmentos no deseados producidos por la división ácida del asociado de fusión es al menos  $\pm 2$ , para permitir que el péptido deseado se aísle desde la mezcla de división mediante cromatografía de intercambio iónico.

2. Un vector según la reivindicación 1, en el que el asociado de la proteína de fusión codificado es una porción N-terminal modificada de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

**MetGluLysLysIleThrGlyTyrThrThrValAspIleSerGlnTyr**

**HisValLeuGluHisPheGluAlaPheGlnSerValAlaGlnSerThrTyrAsnGlnThrValGlnLeuAspIle**

**ThrAlaPheLeuGluThrValGluValAsnValHisLeuPheTyrProAlaPheIleHisIleLeuAlaValLeu**

**LeuAsnAlaHisProLeuPheThrGlyGlyProAsp.**

20 3. Un vector según la reivindicación 1, en el que el asociado de la proteína de fusión codificado tiene una carga neta tal que la proteína de fusión tiene un *pI* de 6,5 a 7,5.

4. Un vector según la reivindicación 1, en el que el péptido deseado es péptido natriurético de tipo b.

5. Un vector según la reivindicación 1, en el que la secuencia reguladora incluye un promotor *phoA*.

25 6. Un vector según la reivindicación 1, en el que el asociado de la proteína de fusión codificado es una porción N-terminal modificada de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que contiene al menos 50 residuos de aminoácidos que corresponden a los 50 residuos de aminoácidos N-terminal de la siguiente secuencia de CAT de tipo silvestre:

**MetGluLysLysIleThrGlyTyrThrThrValAspIleSerGln**

**TrpHisArgLysGluHisPheGluAlaPheGlnSerValAlaGlnCysThrTyrAsnGlnThrValGlnLeuAsp**

**IleThrAlaPheLeuLysThrValLysLysAsnLysHisLysPheTyrProAlaPheIleHisIleLeuAlaArgLeu**

**MetAsnAlaHisProGluPheArgMetAlaMetLys.**

7. Una célula hospedante que contiene el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

```

10                               20
1 MetGluLysLysIleThrGlyTyrThrThrValAspIleSerGlnTirPhi sArgLysGlu
1 MetGluLysLysIleThrGlyTyrThrThrValAspIleSerGlnTyrHisValLeuGlu

30                               40
21 HisPheGluAlaPheGlnSerValAlaGlnCysThrTyrAsnGlnThrValGlnLeuAsp
21 HisPheGluAlaPheGlnSerValAlaGlnSerThrTyrAsnGlnThrValGlnLeuAsp

50                               60
41 IleThrAlaPheLeuLysThrValLysLysAsnLysHisLysPheTyrProAlaPheIle
41 IleThrAlaPheLeuGluThrValGluValAsnValHisLeuPheTyrProAlaPheIle

70
61 HisIleLeuAlaArgLeuMetAsnAlaHisProGluPheArgMetAlaMetLys
61 HisIleLeuAlaValLeuLeuAsnAlaHisProLeuPheThrGlyGlyProAsp

```

FIG. 1

```

Tipo natural  phcA  TGTGTTTTAATTTTAAATGTTATTTGTACATGGAGAAATAAA  GTG
PTH85         TGTGTTTTAATTTTAAATGTTATTTGTACAA  GAGG  CTTCCATATG

```

FIG. 2

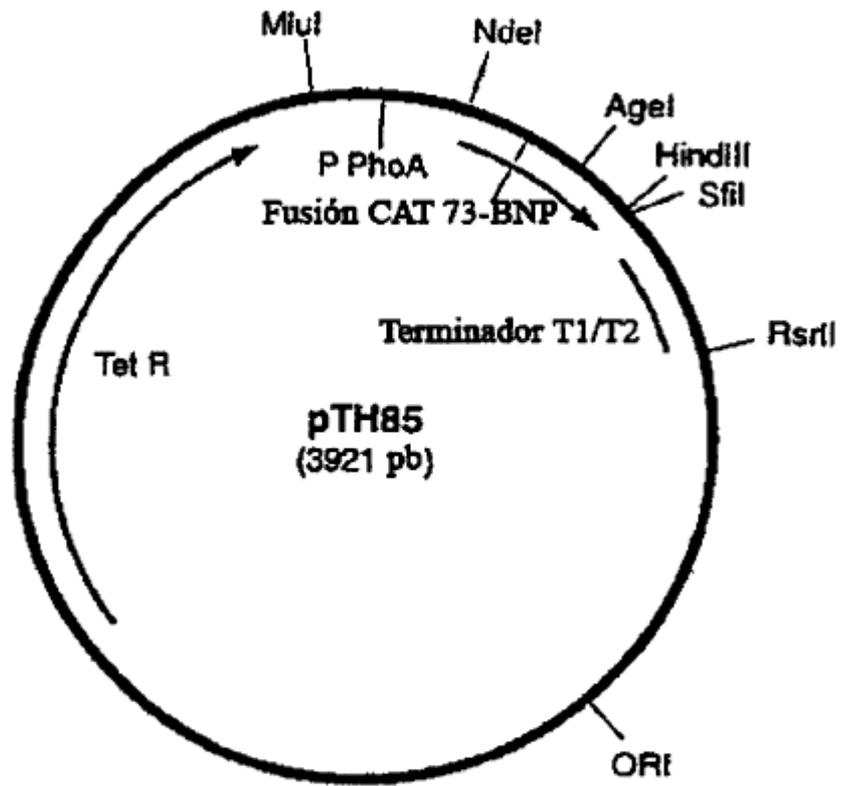


FIG. 3

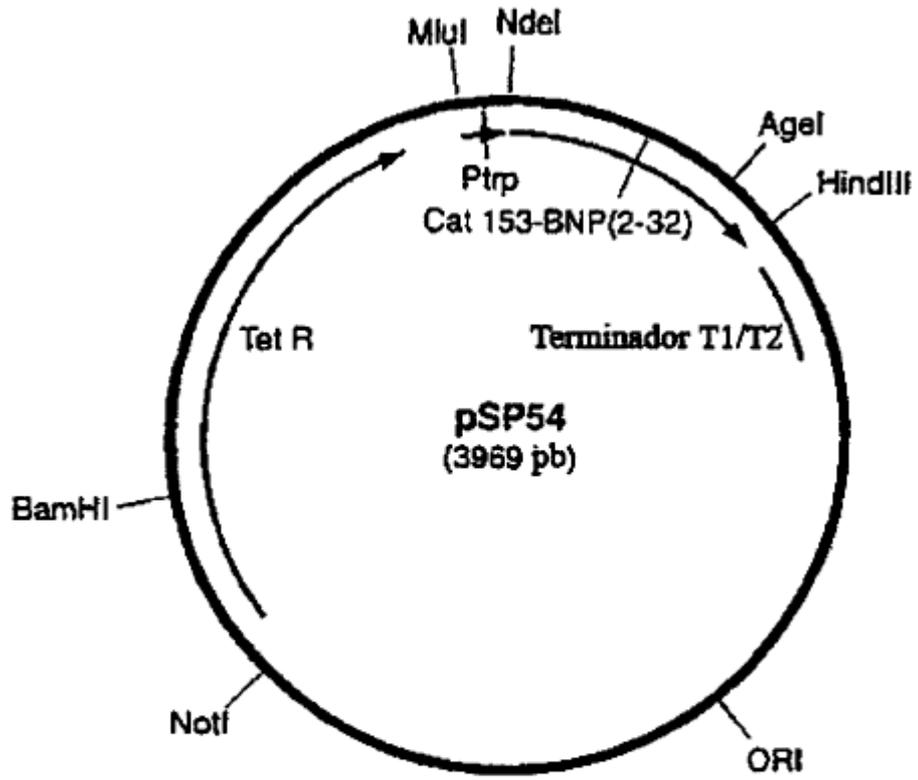


FIG. 4

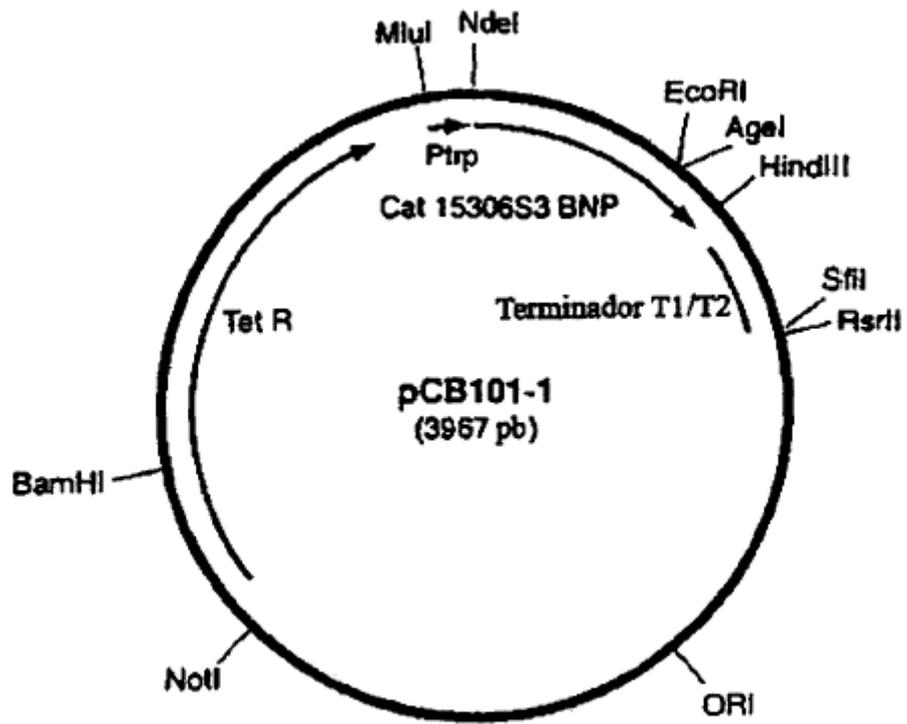


FIG. 5

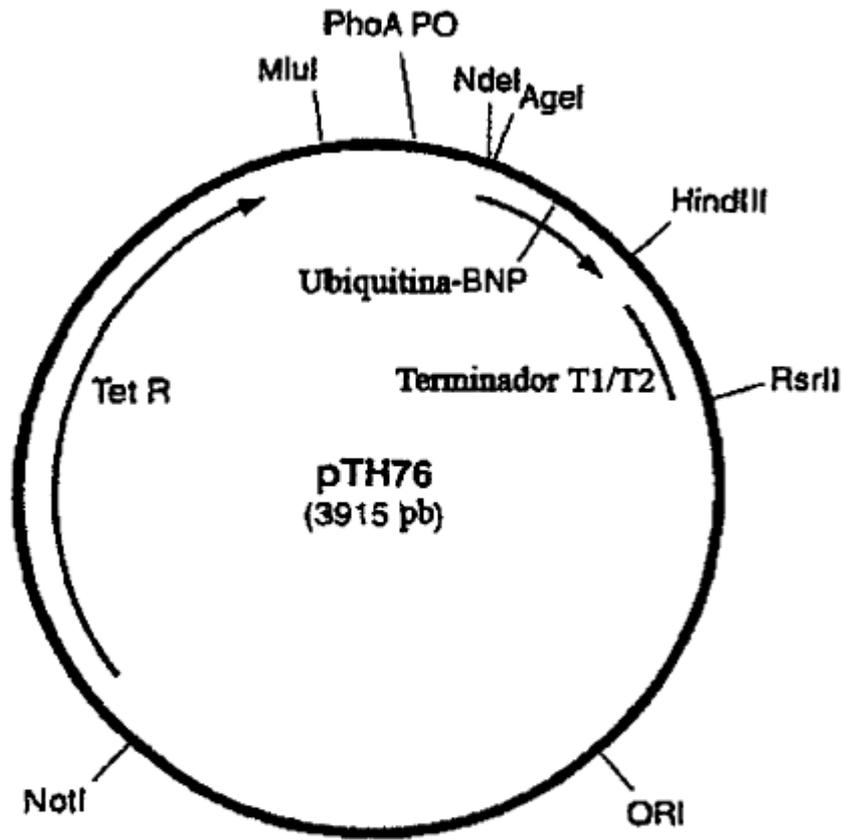


FIG. 6

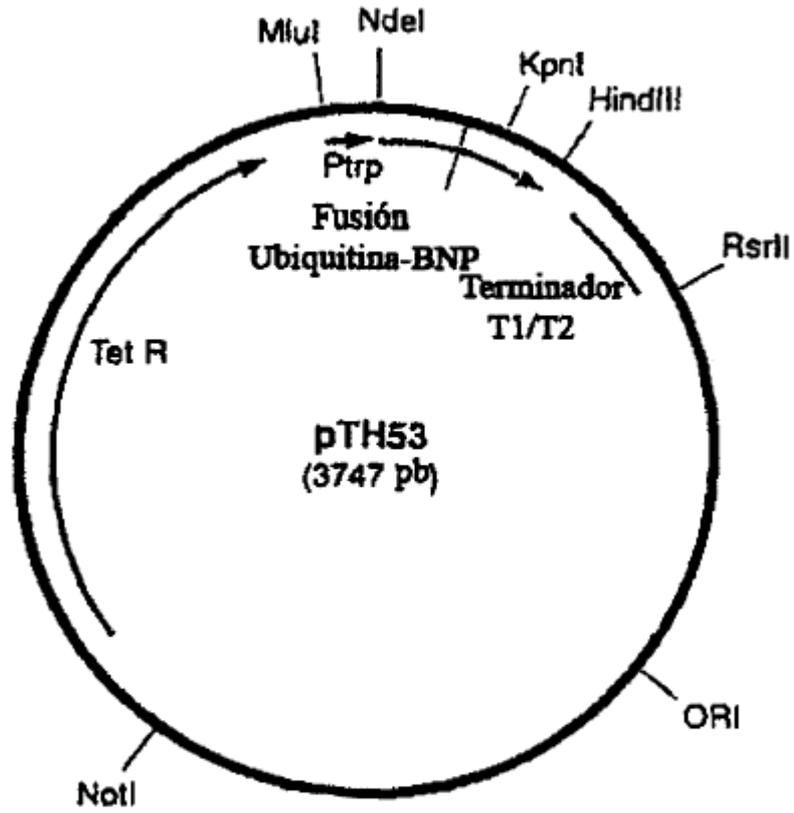


FIG. 7