

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 330**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09006784 .4**

96 Fecha de presentación: **15.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **2088188**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **EXPRESIÓN DIRECTA DE PÉPTIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO.**

30 Prioridad:
16.04.1997 US 43700 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**UNIGENE LABORATORIES, INC.
110 LITTLE FALLS ROAD
FAIRFIELD, NJ 07004-2193, US**

72 Inventor/es:
**Mehta, Nozar, M.;
Ray, Martha, V., L.;
Meenan, Christopher, P. y
Consalvo, Angelo, P.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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).

ES 2 375 330 T3

DESCRIPCIÓN

Expresión directa de péptidos en medios de cultivo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la expresión directa de un producto peptídico en el medio de cultivo de células huésped genéticamente manipuladas que expresan el producto peptídico. Más en particular, la invención se refiere a vectores de expresión, células huésped y/o métodos de fermentación para la producción de un producto peptídico que se excreta fuera del huésped en el medio de cultivo con alto rendimiento. En algunas formas de realización, la invención se refiere a la expresión directa de un producto peptídico que tiene una glicina C-terminal que se convierte después de ello en un péptido amidado que tiene un grupo amino en lugar de dicha glicina.

Descripción de la técnica relacionada

Existen varias técnicas para la producción recombinante de productos peptídicos, es decir, cualquier compuesto cuya estructura molecular incluya una pluralidad de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Un problema cuando el producto peptídico exógeno es pequeño es que con frecuencia se degrada fácilmente por las proteasas endógenas en el citoplasma o periplasma de la célula huésped que se ha usado para expresar el péptido. Otros problemas incluyen alcanzar un rendimiento suficiente y recuperar el péptido en una forma relativamente pura sin alterar su estructura terciaria (lo que puede disminuir de forma indeseable su capacidad de realizar su función básica). Para salvar el problema del tamaño pequeño, el estado de la técnica con frecuencia ha expresado el producto peptídico de interés como una proteína de fusión con otro péptido (habitualmente mayor) y acumulado esta proteína de fusión en el citoplasma. El otro péptido puede servir para varias funciones, por ejemplo, para proteger el péptido de interés de la exposición a proteasas presentes en el citoplasma del huésped. Uno de tales sistemas de expresión se describe en Ray et al., *Bio/Technology*, Vol. 11, páginas 64-70, (1993).

Sin embargo, el aislamiento del producto peptídico usando tal tecnología requiere el corte de la proteína de fusión y la purificación a partir de todos los péptidos normalmente presentes en el citoplasma del huésped. Esto puede necesitar un número de otros pasos que pueden disminuir la eficacia global del proceso. Por ejemplo, donde una proteína de fusión del estado de la técnica se acumula en el citoplasma, las células habitualmente se deben recoger y lisar, y eliminar los restos celulares en un paso de clarificación. Todo esto se evita según la presente invención en donde el producto peptídico de interés se expresa directamente en, y se recupera de, el medio de cultivo.

En el estado de la técnica con frecuencia es necesario usar un paso de cromatografía de afinidad para purificar la proteína de fusión, que debe todavía experimentar corte para separar el péptido de interés de su compañero de fusión. Por ejemplo, en el artículo de *Bio/Technology* anteriormente identificado, el precursor de calcitonina de salmón se cortó de su compañero de fusión usando bromuro de cianógeno. Ese paso de corte aún necesitó pasos adicionales para proteger los grupos sulfhidrilo de las cisteínas en las posiciones 1 y 7 del precursor de calcitonina de salmón. Se usó sulfonación para proporcionar grupos protectores para las cisteínas. Eso a su vez alteró la estructura terciaria del precursor de calcitonina de salmón lo que necesitó la renaturalización posterior del precursor (y por supuesto la eliminación de los grupos protectores).

El producto peptídico de la invención se expresa solo con una secuencia señal y no se expresa con un compañero de fusión grande. La presente invención produce la "expresión directa". Inicialmente se expresa con una región señal unida a su extremo N-terminal. Sin embargo, esa región señal se corta postraduccionalmente durante la secreción del producto peptídico en el periplasma de la célula. Después de ello, el producto peptídico difunde o se excreta de otra manera del periplasma al medio de cultivo fuera de la célula, de donde se puede recuperar en la forma terciaria apropiada. No está unido a ningún compañero de fusión cuya eliminación requeriría primero lisar las células, desnaturalización o modificación, aunque en algunas formas de realización de la invención, se usa la sulfonación para proteger los grupos sulfhidrilo de cisteína durante la purificación del producto peptídico.

Otro problema con la acumulación del producto peptídico según el estado de la técnica en el interior de la célula, es que el producto que se acumula puede ser tóxico para la célula y por tanto puede limitar la cantidad de proteína de fusión que se puede sintetizar. Otro problema con este planteamiento es que el compañero de fusión mayor habitualmente constituye la mayor parte de la producción. Por ejemplo, el 90% del rendimiento de producción puede ser el compañero de fusión mayor, lo que resulta de esta manera en solo el 10% del rendimiento que pertenece al péptido de interés. Aún otro problema con este planteamiento es que la proteína de fusión puede formar cuerpos de inclusión insolubles dentro de la célula, y la solubilización de los cuerpos de inclusión seguida por el corte puede no dar péptidos biológicamente activos.

En el estado de la técnica se ha intentado expresar el péptido junto con un péptido señal unido al extremo N para dirigir el producto peptídico deseado para que se secrete en el periplasma (véase el documento EP 177.343, Genentech Inc.). Se han identificado varios péptidos señal (véase, Watson, M. *Nucleic Acids Research*, Vol. 12, No.13, pp: 5145-5164). Por ejemplo, Hsiung et al. (*Biotechnology*, Vol. 4, Noviembre 1986, pp: 991-995) usaron el péptido señal de proteína de membrana externa A (OmpA) de *E. coli* para dirigir ciertos péptidos al periplasma. Con

mayor frecuencia, los péptidos secretados al periplasma, tienden frecuentemente a permanecer allí con mínima excreción al medio. Se puede requerir un paso adicional indeseable para romper o permeabilizar la membrana para liberar cantidades suficientes de los componentes periplasmáticos. Algunos intentos del estado de la técnica para excretar péptidos del periplasma al medio de cultivo fuera de la célula han incluido comprometer la integridad de la barrera de la membrana externa al hacer que el huésped exprese de forma simultánea el producto peptídico deseado que contiene un péptido señal junto con una proteína péptido lítica que produce que la membrana plasmática se vuelva permeable o con fugas (patente de EE UU No. 4.595.658). Sin embargo, se necesita ser cuidadoso en la cantidad de producción de proteína péptido lítica para no comprometer la integridad celular y matar las células. La purificación del péptido de interés también se puede hacer más difícil por esta técnica.

Aparte de las técnicas de desestabilización de la membrana externa descritas anteriormente hay medios menos rigurosos de permeabilizar la membrana externa de bacterias gram negativas. Estos métodos no producen necesariamente la destrucción de la membrana externa que puede producir menor viabilidad celular. Estos métodos incluyen, pero no están limitados al uso de agentes catiónicos (Martti Vaara., *Microbiological Reviews*, Vol. 56, páginas 395-411 (1992)) y glicina (Kaderbhai et al., *Biotech. Appl. Biochem.*, Vol. 25, páginas 53-61 (1997)). Los agentes catiónicos permeabilizan la membrana externa interaccionando con y causando daño al esqueleto de lipopolisacárido de la membrana externa. La cantidad de daño y desorganización puede ser letal o no dependiendo de la concentración usada. La glicina puede sustituir a residuos de alanina en el componente peptídico del peptidoglicano. El peptidoglicano es uno de los componentes estructurales de la pared celular externa de las bacterias gram negativas. Al cultivar *E. coli* en una concentración alta de glicina aumenta la frecuencia de sustitución glicina-alanina lo que produce una pared celular defectuosa, y por tanto aumenta la permeabilidad.

Otro método del estado de la técnica de producir la excreción de un producto peptídico deseado implica la fusión del producto a una proteína soporte que normalmente se excreta en el medio (hemolisina) o a una proteína entera expresada en la membrana externa (por ejemplo, la proteína ompF). Por ejemplo, la β -endorfina humana se puede excretar como una proteína de fusión por células de *E. coli* cuando está unida a un fragmento de la proteína ompF (EMBO J., Vol. 4, No. 13A, pp: 3589-3592, 1987). Sin embargo, el aislamiento del producto peptídico deseado es difícil, ya que se tiene que separar del péptido soporte e implica alguna (aunque no todas) de las desventajas asociadas con la expresión de péptidos de fusión en el citoplasma.

Aún otro planteamiento del estado de la técnica modifica genéticamente una célula huésped para crear cepas nuevas que tienen una membrana externa permeable que es relativamente incapaz de retener cualquier péptido o proteína periplasmáticos. Sin embargo, estas nuevas cepas pueden ser difíciles de mantener y pueden requerir condiciones rigurosas que afecten de forma adversa al rendimiento del producto peptídico deseado.

Raymond Wong y col. (patente de EE UU No. 5.223.407) idearon aún otro planteamiento para la excreción de productos peptídicos haciendo una construcción de ADN recombinante que comprendía ADN que codificaba la proteína heteróloga acoplado en el mismo marco de lectura con ADN que codifica un péptido señal ompA y una región control que comprende el promotor tac. Este sistema describe rendimientos significativamente menores que los alcanzables usando la presente invención.

Muneki Ohmori et al. (*Agricultural & Biological Chem.* 52 (1988), 2823-2830) divulgan un precursor de calcitonina I de salmón (SCT) producido en *E. coli*, en donde se construyó un ADN bicatenario que codifica SCT-Gly precedido por ATG y seguido por codones de terminación en tándem. La introducción del fragmento en *E. coli* produjo la síntesis de la proteína con una eficiencia alta bajo el control de un promotor tac.

El documento EP 0 261 552 A describe la producción de calcitonina de salmón extendida con glicina (SCT-gly) usando un plásmido en *E. coli*, en donde SCT-gly se convierte a calcitonina de forma enzimática.

Ray et al. (*Abstracts of Papers American Chemical Society* 205 (1993), BIOT 9) describen la expresión directa de un precursor de calcitonina de salmón de 33 aminoácidos en *E. coli* usando un plásmido de expresión que consiste en un promotor inducible con un sitio de unión a ribosoma optimizado y un precursor extendido con glicina para calcitonina de salmón.

Ray et al. (*Abstracts of Papers American Chemical Society* 201 (1991), BIOT 48) describen la producción de calcitonina de salmón recombinante mediante amidación in vitro de un péptido producido en *E. coli*.

Aunque el estado de la técnica puede permitir que se exporten proteínas desde el periplasma al medio, esto puede producir células poco sanas que no se pueden hacer crecer fácilmente hasta las altas densidades deseables, lo que afecta así de forma adversa al rendimiento del producto.

La presente invención busca producir péptidos con alto rendimiento con un vector de expresión eficaz y proporcionar técnicas de cultivo de alto rendimiento y otras mejoras que permitan recuperación con alto rendimiento del péptido de interés excretado del medio de cultivo, sin desorganizar demasiado la integridad de la membrana celular.

Compendio de la invención

Según esto, es un objeto de la presente invención hacer que un producto peptídico se acumule con buen rendimiento en el medio en el que se crecen las células huésped que producen el péptido. Esto es ventajoso debido a que el medio está relativamente libre de muchos contaminantes peptídicos celulares.

Es otro objeto de la invención proporcionar un proceso de fermentación mejorado para aumentar el rendimiento de un producto peptídico expresado por células huésped genéticamente manipuladas.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar células huésped genéticamente manipuladas que son particularmente útiles en la expresión de los nuevos vectores de expresión de la invención.

Es otro objeto de la invención proporcionar una célula huésped que sea particularmente adecuada para la producción de precursor de calcitonina de salmón, independientemente del vector de expresión utilizado para la expresión de calcitonina de salmón.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar métodos mejorados para la producción de péptidos amidados utilizando péptidos precursores que tienen glicinas C-terminales, precursores que se amidan después de la expresión directa en el medio de cultivo según la invención.

En una forma de realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende: (a) una región codificante con ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico acoplado en el mismo marco de lectura en 3' de ácidos nucleicos que codifican un péptido señal; y (b) una región control operativamente unida con la región codificante, dicha región control comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión a ribosomas, en donde al menos uno de dichos promotores es tac. Se proporcionan células huésped transformadas o transfectadas con el vector, como lo son métodos de expresión directa del producto peptídico mediante el cultivo de tales células huésped.

En otra forma de realización, la invención proporciona una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un gen para expresar precursor de calcitonina de salmón o un precursor peptídico relacionado con el gen de calcitonina, dicha célula huésped es la cepa de *E. coli* BLR; y métodos de cultivar la misma para obtener dicho precursor en el medio.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método de producir un producto peptídico amidado produciendo un precursor que tiene una glicina C-terminal usando cualquiera de los vectores, huéspedes o procesos de fermentación descritos en el presente documento; y después de ello, convertir dicha glicina en un grupo amino para producir una amida de péptido.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la expresión directa de un producto peptídico en un medio de cultivo que comprende los pasos de: (a) cultivar, en dicho medio, células huésped genéticamente manipuladas que expresan dicho producto peptídico junto con un péptido señal en condiciones en donde el crecimiento de dichas células huésped se controla para que esté dentro de un intervalo de 0,05 a 0,20 duplicaciones por hora; en donde está presente un inductor durante parte de dicho periodo de crecimiento controlado; y (b) recuperar dicho producto peptídico del medio de cultivo después del corte intracelular del péptido señal.

En otra forma de realización, se añade glicina al medio durante el curso de la fermentación de expresión directa, para aumentar la permeabilidad de la membrana externa y aumentar la excreción del producto peptídico.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B muestran una diagrama esquemático de la construcción del vector pSCT-016B (1A) que se usa en la construcción del vector pSCT-018D (1B) que a su vez se usa en la construcción del vector pSCT-025.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSCT-019. El casete LAC-OMPASCTGLY usado en la construcción de pSCT-025 se hizo mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una parte de pSCT-019.

La figura 3 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSCT-025 que se usó en la construcción de los vectores pSCT-029A, pSCT-025A, pSCT-037 y pSCT-038.

La figura 4 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSCT-029A que se usó en la construcción de los vectores pSCT-038 y pSCT-034. Además, pSCT-029A se usó para transformar *E. coli* BLR y producir el nuevo clon digénico UGL 165.

La figura 5 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSEC-E que se usó en la construcción del vector pSEC-EY.

La figura 6 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pPRLA4 que se usó en la construcción del vector pSEC-EY.

La figura 7 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSEC-EY que se usó en la construcción de los vectores pSCT-037 y pSCT-038.

La figura 8 muestra un diagrama esquemático de la construcción de los vectores pSCT-037 y pSCT-038. pSCT-037 se usó para transformar *E. coli* BLR y producir el clon monogénico UGL 702. pSCT-038 se usó para transformar *E. coli* BLR y producir el clon digénico UGL 703. pSCT-038 contiene dos copias del operón OmpA-sCTgly (que codifica la señal OmpA junto con el precursor de calcitonina de salmón) lo que lo hace un nuevo vector de expresión digénico. También contiene copias de genes que codifican dos proteínas de la maquinaria sec que aumentan la translocación a través de la membrana interna en el espacio periplásmico. La siguiente es una lista de abreviaturas usadas en la descripción de este vector de la figura 8:

TAC – promotor híbrido de triptófano E y secuencias del operador lac,
 P/O LAC – región que contiene el promotor lac y el operador lac del gen de la β galactosidasa;
 LAC-IQ – gen que codifica el represor lac que se une a la región del operador del promotor lac y el promotor tac.
 IPTG compete con el represor lac e inhibe la unión del represor lac a la región del operador tanto del promotor tac como del promotor lac, induciendo de esta manera dichos promotores.
 P/O TRP – región de operador promotor del gen triptófano E;
 OMPA-SCTGLY – Gen fusión que contiene la secuencia señal secretora del gen de la proteína de membrana externa A y la secuencia codificante de calcitonina de salmón extendida con glicina (precursor de calcitonina de salmón);
 SEC-E (también conocido como “PrIG”) – gen que codifica el factor de secreción E de *E. coli*. Se combina con prlA [también conocido como sec-Y] o prlA-4 para formar el dominio de translocación de la membrana interna de la ruta sec mediante la cual las proteínas que contienen secuencias señal se translocan desde el citoplasma al periplasma;
 PRLA-4 – alelo mutante del gen prlA;
 RRNB T1-T2 – terminadores de transcripción en tándem 1 y 2 del gen de la proteína ribosómica de *E. coli*; y
 KAN-R – gen de resistencia a kanamicina.

La figura 9 muestra un diagrama esquemático del vector pSCT-034 que se usó para transformar *E. coli* BLR y producir el clon trigénico UGL 168.

La figura 10 muestra el crecimiento celular y la producción de sCTgly del clon UGL 165 (plásmido pSCT029A en *E. coli* BLR) a lo largo del tiempo después de una fermentación típica de 1 litro en presencia de inductor. El crecimiento celular se midió por absorbancia de luz a una longitud de onda de 600 nm. La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. El tiempo cero indica el tiempo al que se añade el inductor por primera vez al medio de cultivo donde se cultivan células huésped de la invención. La figura 10 muestra que la mayor parte de la producción de sCTgly por UGL 165 se produce entre las 20 y 25,5 horas después de añadir el inductor al medio de cultivo donde se cultivan las células huésped de la invención.

La figura 11 muestra el crecimiento celular y la producción de sCTgly del clon UGL 703 (plásmido pSCT 038 en *E. coli* BLR) a lo largo del tiempo después de una fermentación típica de 1 litro en presencia de inductor. El crecimiento celular se midió por absorbancia de luz a una longitud de onda de 600 nm. La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. El tiempo cero indica el tiempo al que se añade el inductor por primera vez al medio de cultivo donde se cultivan células huésped de la invención. La figura 11 muestra que la mayor parte de la producción de sCTgly por UGL 703 se produce entre 20 y 26 horas después de cultivar en presencia del inductor.

La figura 12 muestra una comparación del crecimiento celular del clon 172 (plásmido pSCT 025 en *E. coli* BLR), el clon UGL 165 y el clon UGL 168 (plásmido pSCT 034 en *E. coli* BLR) en una fermentación típica de 1 litro durante el tiempo después de incubación en presencia de inductor medido mediante absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. La figura 12 no muestra diferencias significativas en las velocidades de crecimiento celular de UGL 165 y UGL 172 mientras que UGL 168 muestra una ligera reducción en la velocidad de crecimiento celular en este experimento particular.

La figura 13 muestra una comparación de la producción de sCTgly por el clon 172, el clon UGL 165 y el clon UGL 168 durante el tiempo en una fermentación típica de 1 litro después de incubación en presencia de inductor descrita como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. La figura 13 muestra que el clon digénico UGL 165 es el más adecuado para la producción de sCTgly siendo el clon trigénico el segundo mejor sobre el clon monogénico UGL 173.

Las figuras 14A y 14B muestran una comparación de la producción de sCTgly (14A) y crecimiento celular (14B) durante el tiempo después de una fermentación típica de 1 litro en presencia de inductor por el clon UGL 165 y bien en presencia o en ausencia de suplemento de oxígeno a la alimentación de aire. El crecimiento celular se midió como g de peso celular húmedo por litro de medio de incubación. La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. Las figuras 14A y 14B muestran que el oxígeno añadido en el medio de fermentación no es crítico para el crecimiento celular de UGL 165 pero es muy importante en aumentar la producción de sCTgly.

Las figuras 15A y 15B muestran una comparación del crecimiento celular (15A) y la producción de sCTgly (15B) durante el tiempo después de una fermentación típica de 1 litro en presencia de inductor por las cepas de *E. coli* WA837 y BLR donde cada cepa expresa el vector pSCT-029A (UGL164 y UGL165, respectivamente). El crecimiento celular se midió por absorbancia de luz a una longitud de onda de 600 nm. La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. Las figuras 15A y 15B muestran que la cepa de *E. coli* BLR es más adecuada para la producción de sCTgly que la cepa de *E. coli* WA837.

La figura 16 muestra una comparación de producción de sCTgly después de una fermentación típica de 1 litro en presencia de inductor por las cepas de *E. coli* WA837, BLR, BL21 y B834, donde cada cepa expresa el vector pSCT-029A (UGL164, UGL165, UGL167 y UGL166, respectivamente). La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. La figura 16 muestra que la cepa de *E. coli* BLR es más adecuada para la producción de sCTgly que la cada una de las cepas de *E. coli* WA837, BL21 y B834.

La figura 17 muestra una comparación de la mejor producción de sCTgly observada a partir de diferentes experimentos después de fermentaciones de 1 litro en presencia de inductor por los clones UGL 165 (pSCT-029A en BLR), UGL 168 (pSCT-034 en BLR), UGL 172 (pSCT-025 en BLR), UGL 702 (pSCT-037 en BLR) y UGL 703 (pSCT-038 en BLR). La producción de sCTgly se describió como mg de sCTgly excretada por litro de medio de incubación. La figura 17 muestra que los clones digénicos UGL 703 y UGL 165 son más adecuados para la producción de sCTgly que los clones monogénicos UGL 172 y UGL 702 y el clon trigénico UGL 168. La figura 17 también muestra que el clon digénico UGL 703 que expresa factores de secreción es más adecuado para la producción de sCTgly que el clon digénico UGL 165 que no expresa factores de secreción.

Descripción detallada de la invención

La presente invención permite rendimientos de productos peptídicos que superan los 100 mg por litro de medio. Lo hace así con nuevos vectores de expresión, nuevos huéspedes (transformados, transfectados o usados según la invención), nuevos procesos de fermentación o una combinación de dos o más de los anteriores.

Visión general de un vector de expresión preferido

En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una región codificante y una región control. La región codificante comprende ácidos nucleicos para un producto peptídico de interés acoplado en el mismo marco de lectura en 3' de los ácidos nucleicos que codifican un péptido señal. La región control está operativamente unida a la región codificante y comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión a ribosomas, en donde al menos uno de los promotores se selecciona del grupo que consiste en tac y lac.

Preferiblemente, el vector comprende una pluralidad de casetes de transcripción colocados en tándem, cada casete tiene la región control y la región codificante de la presente invención. Se cree que tal vector digénico o vector multigénico proporciona expresión mejor de lo que lo haría un vector de expresión dicistrónico o multicistrónico. Esta es una mejora sorprendente sobre la expresión dicistrónica o multicistrónica que no se cree que se sugiera en el estado de la técnica.

El vector opcionalmente puede comprender además ácidos nucleicos que codifican un péptido represor que reprime los operadores asociados con uno o más de los promotores en la región control, una región de terminación de la transcripción, una región de marcador de selección y/o una región que codifica al menos un péptido que aumenta la secreción. De forma alternativa, en algunas formas de realización, pueden estar presentes ácidos nucleicos que codifican un péptido represor y un péptido que aumenta la secreción en un vector separado coexpresado en la misma célula huésped que el vector que expresa el producto peptídico.

Se muestran ejemplos específicos de vectores de expresión contruidos y métodos para construir tales vectores de expresión posteriormente. Se pueden utilizar muchos vectores comercialmente disponibles como vectores de partida para los vectores preferidos de la invención. Algunas de las regiones preferidas de los vectores de la invención pueden estar ya incluidas en el vector de partida de modo que el número de modificaciones requeridas para obtener el vector de la invención es relativamente modesto. Los vectores de partida preferidos incluyen, pero no están limitados a, pSP72 y pKK233-2.

Se cree que los nuevos vectores de la invención imparten ventajas que son inherentes a los vectores, y que esas ventajas inesperadas estarán presentes incluso si los vectores se utilizan en células huésped diferentes de los huéspedes particulares identificados como particularmente útiles en el presente documento, e independientemente de si se usa el proceso de fermentación mejorado descrito en el presente documento.

Asimismo, en ciertas formas de realización, las células huésped particulares se identifican como que son particularmente útiles en la expresión de péptidos tales como el precursor de calcitonina de salmón y precursor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Las ventajas impartidas por utilizar específicamente las células huésped particulares identificadas en el presente documento se cree que existen independientemente de si el vector de expresión es uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento o si se utiliza el nuevo proceso de fermentación descrito en el presente documento. En otras palabras, se cree que estas células huésped impartirán ventajas significativas inesperadas incluso utilizando fermentación del estado de la técnica o vectores del estado de la técnica.

Se cree que el nuevo proceso de fermentación proporciona rendimiento aumentado debido a las ventajas inherentes impartidas por el proceso de fermentación. Se cree que estas ventajas estarán presentes independientemente de si se utilizan las células huésped preferidas y/o los nuevos vectores descritos en el presente documento.

A pesar de lo anterior, una forma de realización preferida de la invención utiliza simultáneamente los vectores de expresión mejorados de la invención, transformados en las células huésped particularmente identificadas de la invención y expresados utilizando la fermentación preferida de la invención descrita en el presente documento. Cuando se usan en combinación todas estas tres de invenciones, se cree que se puede alcanzar una mejora significativa del rendimiento y la recuperación de producto relativos al estado de la técnica.

La región control

La región control está operativamente unida a la región codificante y comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión a ribosomas, en donde al menos uno de los promotores se selecciona del grupo que consiste en lac y tac. Se ha encontrado, sorprendentemente, que la combinación anterior de promotores en una única región control aumenta significativamente el rendimiento de un producto peptídico producido por la región codificante (como se describe en más detalle posteriormente). Se esperaba que dos de tales promotores proporcionaran en gran parte funciones redundantes y no proporcionarían ningún efecto aditivo o sinérgico. Experimentos realizados por los solicitantes han mostrado sorprendentemente una sinergia al usar la combinación reivindicada de promotores. En la técnica se conocen otros promotores y se pueden usar en combinación con un promotor tac o lac según la invención. Tales promotores incluyen pero no están limitados a lpp, ara B, trpE, gal K.

Preferiblemente, la región control comprende exactamente dos promotores. Cuando uno de los promotores es tac, se prefiere que el promotor tac esté en 5' de otro promotor en la región control. Cuando uno de los promotores es lac, el promotor lac está preferiblemente en 3' del otro promotor en la región control. En una forma de realización, la región control comprende tanto un promotor tac como un promotor lac, preferiblemente con el promotor lac en 3' del promotor tac.

La región codificante

La región codificante comprende ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico de interés acoplado en el mismo marco de lectura en 3' de los ácidos nucleicos que codifican un péptido señal por lo cual la región codificante codifica un péptido que comprende, respectivamente, desde el extremo N al extremo C la señal y el producto peptídico. Sin pretender estar unidos por ninguna teoría, se cree que la señal puede proporcionar alguna protección al producto peptídico de degradación proteolítica además de participar en su secreción al periplasma.

Se conocen muchas secuencias señal de péptidos y se pueden usar según la invención. Estas incluyen secuencias señal de proteínas de la membrana externa de células huésped bien caracterizadas, y cualquier secuencia capaz de translocar el producto peptídico al periplasma y de ser cortado postraduccionalmente por el huésped como resultado de la translocación. Los péptidos señal útiles incluyen, pero no están limitados a, Omp A, pel B, Omp C, Omp F, Omp T, β -la, Pho A, Pho S y Staph A.

El producto peptídico preferiblemente es lo suficientemente pequeño de modo que, ausente la presente invención, requeriría habitualmente un compañero de fusión usando la tecnología del estado de la técnica. Típicamente, el producto peptídico tiene un peso molecular de menos de 10 kDa. Más preferiblemente, el producto peptídico tiene una glicina C-terminal, y se usa como un precursor para una reacción de amidación enzimática que convierte la glicina C-terminal en un grupo amino, lo que produce de esta manera un péptido amidado. Tal conversión se describe en más detalle posteriormente. Numerosas hormonas y neurotransmisores peptídicos biológicamente importantes son péptidos amidados de este tipo. Por ejemplo, el producto peptídico codificado por la región codificante puede ser precursor de calcitonina de salmón o precursor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, que ambos tienen glicinas C-terminales y que ambos se pueden amidar enzimáticamente a calcitonina madura de salmón o péptido relacionado con el gen de la calcitonina maduro. Otros péptidos amidados que se

pueden producir según la invención incluyen, pero no están limitados a, factor liberador de hormona del crecimiento, péptido intestinal vasoactivo y galanina. En la técnica se conocen bien otros péptidos amidados.

También se podrían producir análogos de la hormona paratiroidea según la invención. Por ejemplo, un péptido que tiene los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea puede proporcionar una función similar a la de la hormona paratiroidea misma, como puede una versión amidada del análogo de 34 aminoácidos. La última se puede producir expresando, según uno o más de los sistemas de expresión y métodos descritos en el presente documento, los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea seguidos por glicina-35. La amidación enzimática como se divulga en el presente documento podría convertir después la glicina en un grupo amino.

Mientras que las formas de realización preferidas del sistema de expresión directa descrito en el presente documento producen péptidos que tienen una glicina C-terminal, se cree que cualquier péptido disfrutará de un buen rendimiento y fácil recuperación utilizando los vectores, huéspedes y/o técnicas de fermentación descritas en el presente documento.

Otros aspectos opcionales de un vector preferido de la invención o de otros vectores que se van a expresar en el mismo huésped que el vector de la invención

Represor

Opcionalmente, el vector preferido de la presente invención puede contener ácidos nucleicos que codifican un péptido represor capaz de reprimir la expresión controlada por al menos uno de los promotores. Sin embargo, de forma alternativa, los ácidos nucleicos que codifican un péptido represor pueden estar presentes en un vector separado en una célula huésped con el vector de la presente invención. En la técnica se conocen represores apropiados para un gran número de operadores. Preferiblemente, los ácidos nucleicos que codifican el represor codifican un represor lac en formas de realización preferidas de la invención ya que reprime el operador lac que está incluido en el promotor tac y en el lac, al menos uno de los promotores que está siempre presente en vectores preferidos de la invención.

Marcador de selección

Se prefiere que esté presente cualquiera de un gran número de genes de marcadores de selección (por ejemplo, un gen que codifica resistencia a kanamicina) en el vector de la presente invención. Esto permitirá la selección específica apropiada de las células huésped que se transforman o transfectan eficazmente con el nuevo vector de la invención.

Péptido que aumenta la secreción

Los ácidos nucleicos que codifican al menos un péptido que aumenta la secreción están opcionalmente presentes en el vector de la presente invención. De forma alternativa, los ácidos nucleicos que codifican un péptido que aumenta la secreción pueden estar presentes en un vector separado expresado en la misma célula huésped que el vector que codifica el producto peptídico. Preferiblemente, el péptido que aumenta la secreción se selecciona del grupo que consiste en SecY (prlA) o prlA-4. Se señala que SecY y prlA son idénticos, usándose en la técnica los dos términos como sinónimos. prlA-4 es una modificación conocida de prlA y tiene una función similar. Otro péptido preferido que aumenta la secreción es SecE también conocido como "prlG", un término usado como sinónimo para "SecE". Lo más preferiblemente, se codifican una pluralidad de péptidos que aumentan la secreción, al menos uno de los cuales es SecE y el otro de los cuales se selecciona del grupo que consiste en SecY (prlA) y prlA-4. Se cree que los dos interaccionan para ayudar a la translocación del producto peptídico desde el citoplasma al periplasma. Sin pretender estar unido por ninguna teoría, estos péptidos que aumentan la secreción pueden ayudar a proteger el producto peptídico de las proteasas citoplásmicas además de sus funciones de aumentar la secreción.

Célula huésped

La presente invención también proporciona una célula huésped transformada o transfectada con cualquiera de los vectores de la presente invención. Preferiblemente, la célula huésped es una célula bacteriana. Más preferiblemente, la célula huésped es una célula bacteriana gram negativa. Aún más preferiblemente, la célula huésped es *E. coli*. Más preferiblemente, la *E. coli* es la cepa BLR, BL21 o WA837. Lo más preferiblemente, la *E. coli* es la cepa BLR. También lo más preferiblemente, la célula huésped expresa además al menos un péptido que aumenta la secreción.

La presente invención proporciona además una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un gen para expresar precursor de calcitonina de salmón o precursor del péptido relacionado con el gen de calcitonina de salmón, dicha célula huésped es la cepa BLR de *E. coli*. Se cree que la expresión en BLR de estos dos péptidos será particularmente eficaz incluso donde se usan vectores del estado de la técnica para la expresión. En otras palabras, no se cree que se requieran los nuevos vectores de expresión descritos en el presente documento para una buena expresión de estos dos péptidos en un huésped BLR.

Método de producir un péptido heterólogo

Se proporcionan nuevas condiciones de fermentación para el crecimiento de células huésped a densidades celulares muy altas en condiciones de cultivo que permiten la difusión o excreción del producto peptídico en el medio de cultivo con alto rendimiento.

Las células huésped útiles en la nueva fermentación incluyen, pero no están limitadas a, las células huésped discutidas anteriormente, y/o células huésped transformadas o transfectadas con uno o más de los nuevos vectores de expresión discutidos anteriormente. Se pueden usar otras células huésped genéticamente manipuladas para que expresen el producto peptídico junto con una región señal. Las células se colocan en un fermentador que preferiblemente incluye medios apropiados de aire de alimentación u otros gases, fuente de carbono y otros componentes al medio y medios para la inducción del promotor. También se prefieren medios adecuados para seguir el contenido de oxígeno, densidad celular, pH y similares.

Los solicitantes han encontrado que se obtiene un rendimiento significativamente mejorado del producto directamente expresado en el medio de cultivo controlando cuidadosamente la velocidad media de crecimiento celular dentro de un intervalo crítico entre 0,05 y 0,20 duplicaciones por hora. Se prefiere que este crecimiento controlado empiece en la fase de latencia temprana del cultivo. Es más preferible mantener la velocidad media de crecimiento celular durante el periodo de fermentación (es decir, el periodo durante el que el crecimiento se controla como se explica en el presente documento), entre 0,10 y 0,15 duplicaciones por hora, lo más preferiblemente 0,13 duplicaciones por hora. La velocidad de crecimiento se puede controlar ajustando cualquiera de los parámetros explicados posteriormente en la sección titulada "Producción de sCTgly (Fermentación)", específicamente la fórmula que iguala la velocidad de alimentación "Q" a otros numerosos parámetros. Los solicitantes han encontrado que variar la velocidad de la fuente de carbono que se alimenta a las células en fermentación es un método ventajoso de mantener la velocidad de crecimiento dentro del intervalo crítico. Para mantener la velocidad de crecimiento relativamente constante, la cantidad de fuente de carbono que se alimenta en el fermentador tiende a aumentar proporcionalmente al crecimiento en número de células.

Los solicitantes también han descubierto que se puede obtener un rendimiento significativamente mejorado proporcionando un inductor durante dicho periodo de fermentación de crecimiento controlado. Como fuente de carbono, alimentar cantidades apropiadas de inductor implica aumentar la velocidad de alimentación proporcional al crecimiento en número de células. Puesto que tanto la alimentación de la fuente de carbono como del inductor preferiblemente aumentan de una manera que está unida al crecimiento celular, los solicitantes han determinado que es ventajoso mezclar alimentación e inductor entre sí y alimentar la mezcla de los dos a la velocidad apropiada para controlar el crecimiento celular (con la fuente de carbono), manteniendo de esta manera simultáneamente una alimentación continua de inductor que permanece a una relación constante respecto a la cantidad de fuente de carbono. Sin embargo, es posible, por supuesto, alimentar la fuente de carbono y el inductor por separado. Incluso entonces, sin embargo, si se usa un inductor químico que pueda ser tóxico para las células en grandes cantidades, es deseable que el inductor y la fuente de carbono se añadan durante cada hora de cultivo en cantidades tales que la relación en peso del inductor añadido a cualquier hora determinada respecto a la fuente de carbono añadida a esa misma hora no varíe en más del 50% de la relación de la cantidad de inductor añadido durante la totalidad del proceso de fermentación (periodo de crecimiento controlado) respecto a la cantidad de la fuente de carbono añadida durante la totalidad del proceso de fermentación. La variación del 50% se mide a partir de la relación menor de dos relaciones que se comparan. Por ejemplo, donde la relación de fuente de carbono a inductor para la fermentación entera sea 2 a 1, la relación a cualquier hora determinada es preferiblemente no mayor de 3 a 1 y no menor de 1,333 a 1. También es posible inducir uno o más de los promotores durante el crecimiento por otros medios tales como un cambio en la temperatura del cultivo o cambiar la concentración de un compuesto o nutriente particular.

Cuando se usa alimentación de fuente de carbono externa como el método de controlar el crecimiento celular, es útil esperar hasta que cualquier fuente de carbono inicialmente en el medio (antes de la alimentación externa de carbono) se haya agotado hasta el punto donde el crecimiento no se puede apoyar más sin iniciar la alimentación externa de carbono. Esto asegura que la alimentación externa tiene un control más directo sobre el crecimiento celular sin interferencia significativa de fuentes de carbono iniciales (sin alimentación). Preferiblemente se alimenta una fuente de oxígeno continuamente en el medio de fermentación midiendo los niveles de oxígeno disueltos. Un pico en el nivel de oxígeno indica una caída significativa en el crecimiento celular que puede a su vez indicar agotamiento de la fuente de carbono inicial y significa que es tiempo de empezar la alimentación externa.

Se ha encontrado inesperadamente que el rendimiento del producto peptídico aumenta según aumenta la saturación de oxígeno del medio de fermentación. Esto es cierto incluso aunque niveles de saturación de oxígeno menores son suficientes para mantener el crecimiento celular. Por tanto, durante el proceso de fermentación entero, se prefiere que se alimente oxígeno o una fuente enriquecida en oxígeno al medio de fermentación, y que se alcance al menos el 20% y preferiblemente al menos el 50% de saturación de oxígeno. Como se usa en el presente documento "saturación de oxígeno" significa el porcentaje de oxígeno en el medio de fermentación cuando el medio está completamente saturado con aire normal. En otras palabras, el medio de fermentación saturado con aire tiene una "saturación de oxígeno" del 100%. Mientras que es difícil mantener la saturación de oxígeno del medio de

fermentación significativamente por encima del 100%, es decir, por encima del contenido de oxígeno del aire, esto es posible, e incluso deseable en vista de que el mayor contenido en oxígeno proporciona mayores rendimientos. Esto se puede alcanzar burbujando el medio con gases que tienen mayor contenido en oxígeno que el aire.

- 5 Se puede alcanzar mejora significativa en el rendimiento manteniendo la saturación de oxígeno en el medio de fermentación a no menos del 70%, en especial no menos del 80%. Esos niveles son relativamente fáciles de mantener.

- 10 La agitación más rápida puede ayudar a aumentar la saturación de oxígeno. Una vez que el medio de fermentación empieza a espesarse, se hace más difícil mantener la saturación de oxígeno, y se recomienda alimentar gases con mayor contenido en oxígeno que el aire, al menos en esta fase. Los solicitantes han encontrado que el aire normal puede ser suficiente para mantener una buena saturación de oxígeno hasta relativamente tarde en el periodo de fermentación. Los solicitantes han suplementado la alimentación de aire con una alimentación de oxígeno al 50% o una alimentación de oxígeno al 100% posteriormente en el periodo de fermentación. Preferiblemente, la célula huésped se cultiva durante un periodo de entre 20 y 32 horas (después de empezar el crecimiento controlado), más preferiblemente entre 22 y 29 horas, lo más preferiblemente durante aproximadamente 24-27 horas.

- 15 Preferiblemente, las células huésped se incuban a una temperatura de entre 20 y 35°C, más preferiblemente entre 28 y 32°C, más preferiblemente entre 29,5 y 30,5°C. Se ha determinado que una temperatura de 30°C es óptima en varias fermentaciones realizadas por los solicitantes.

Preferiblemente, el pH del medio de cultivo está entre 6,0 y 7,5, más preferiblemente entre 6,6 y 7,0, siendo 6,78-6,83 (por ejemplo, 6,8) especialmente preferido.

- 25 En formas de realización preferidas, la fermentación se lleva a cabo usando huéspedes transformados con un vector de expresión que tiene una región control que incluye tanto un promotor tac como uno lac y una región codificante que incluye nucleótidos que codifican un péptido señal en 5' de nucleótidos que codifican precursor de calcitonina de salmón. Tal vector de expresión, preferiblemente, incluye una pluralidad, en especial dos, casetes de transcripción en tándem. Como se usa en el presente documento, el término "casetes de transcripción en tándem" significa que una región control y codificante están seguidas por al menos una región control adicional y al menos una región codificante adicional que codifica el mismo producto peptídico que la primera región codificante. Esto se debe distinguir de la expresión dicistrónica en la que una única región control controla la expresión de copias de la región codificante. La definición permite cambios en la región codificante que no se refieren al producto peptídico, por ejemplo, inserción, en el segundo casete de transcripción, de nucleótidos que codifican un péptido señal diferente del que se codifica en el primer casete de transcripción.

- 30 En la técnica se conocen numerosas fuentes de carbono. Se ha determinado que el glicerol es eficaz. Los métodos preferidos de inducción incluyen la adición de inductores químicos tales como IPTG y/o lactosa. Se pueden usar otros métodos tales como cambio de temperatura o alteraciones en los niveles de nutrientes. También se pueden usar otras técnicas de inducción apropiadas para el operador o el promotor en la región control (o uno de la pluralidad de promotores que se usan donde aparece más de uno en la región control).

- 35 Es típico que la producción del producto peptídico caiga significativamente a aproximadamente el mismo tiempo que el crecimiento de las células en el medio de fermentación se hace insostenible en la velocidad de crecimiento preferida discutida anteriormente. En este punto, la fermentación se para, la alimentación de la fuente de carbono e inductor y el flujo de oxígeno se interrumpen. Preferiblemente, el cultivo se enfría rápidamente para eliminar la actividad de proteasas y de esta manera reducir la degradación del producto peptídico. También es deseable modificar el pH a un nivel que reduzca sustancialmente la actividad proteolítica. Cuando se produce precursor de calcitonina de salmón usando los vectores y células huéspedes preferidos de la invención, la actividad proteolítica disminuye según se baja el pH. Esta acidificación preferiblemente procede de forma simultánea con el enfriamiento del medio¹. Los intervalos de pH preferidos se discuten en más detalle posteriormente. El mismo ensayo que se usa para medir el producto de fermentación se puede usar para medir la degradación a diferentes niveles de pH, estableciendo de esta manera un pH óptimo para un péptido determinado y sus impurezas.

55 Recuperación del péptido heterólogo

- La presente invención proporciona además un método para recuperar el producto peptídico que comprende separar las células huésped del medio de cultivo y después de ello someter el medio de cultivo a al menos un tipo de cromatografía seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de filtración en gel, de intercambio iónico (preferiblemente intercambio catiónico cuando el péptido es calcitonina), de fase inversa, de afinidad y de interacción hidrofóbica. En un péptido que contiene residuos de cisteína, se puede llevar a cabo S-sulfonación antes de o durante los pasos de purificación para prevenir la agregación del péptido y aumentar de esta manera el rendimiento

¹ o se puede llevar a cabo después de la eliminación de las células bacterianas

de péptido monomérico. Preferiblemente, se usan tres pasos de cromatografía en el siguiente orden: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa y otra cromatografía de intercambio iónico.

Después de completar la fermentación, el pH del medio de cultivo opcionalmente se cambia para reducir la actividad proteolítica. El ensayo usado para medir la producción de producto también se puede usar para medir la degradación de producto y para determinar el mejor pH para la estabilidad. Donde se produce precursor de calcitonina de salmón según la invención, se prefiere un pH entre 2,5 y 4,0, especialmente entre 3,0 y 3,5. También se cree que estos intervalos de pH ayudan a la retención del precursor de calcitonina de salmón en las columnas de intercambio catiónico, lo que proporciona así una mejor purificación durante una técnica de purificación preferida descrita en el presente documento.

También opcionalmente, la temperatura del medio, después de que se haya completado la fermentación, se baja a una temperatura por debajo de 10°C, preferiblemente entre 3°C a 5°C, lo más preferiblemente a 4°C. También se cree que esto reduce la actividad proteasa indeseable.

La presente invención proporciona además un método de producir un producto peptídico amidado que comprende los pasos de: cultivar, en un medio de cultivo, cualquiera de las células huésped de la presente invención que expresan un producto peptídico que tiene una glicina C-terminal; recuperar dicho producto peptídico de dicho medio de cultivo; amidar dicho producto peptídico poniendo en contacto dicho producto peptídico con oxígeno y un agente reductor en presencia de peptidil glicina α -amidante monooxigenasa, o peptidil glicina α -hidroxilante monooxigenasa. Si no usa peptidil glicina α -amidante monooxigenasa en el presente documento anteriormente, y si la mezcla de reacción no es ya básica, entonces se aumenta el pH de la mezcla de reacción hasta que sea básico. El péptido amidado se puede recuperar después de ello de la mezcla de reacción preferiblemente utilizando la técnica de purificación descrita posteriormente en el ejemplo 6.

Preferiblemente, la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en presencia de un inductor, mientras se mantiene una velocidad media de crecimiento celular durante el cultivo de entre 0,05 y 0,20 duplicaciones por hora.

Detalles experimentales

Estrategia de clonación de pSCT-037 y pSCT-038

La construcción de pSCT-038 y pSCT-037 comprende ocho partes que convergen para crear los vectores intermedios necesarios para construir los plásmidos de expresión finales deseados. Todos los genes y fragmentos que se usaron o construyeron fuera de la descripción del texto para este proyecto se enumeran en la tabla 1.

Parte I Construcción de pSCT-018D

Se subclonó el cartucho del promotor TAC (tabla 1) en pGEM11ZF+ (tabla 1) como un fragmento Hind III-Bam HI creando pGEM11ZF+TAC. Se ligó el gen pelB-sCTgly cas2 (tabla 1) en 3' del promotor tac (en pGEM11ZF+TAC) en el sitio Bam HI para crear el vector de expresión pSCT-013B. El operón tac-pelBsCTgly se cortó de pSCT-013B usando Hind III y Eco RI. Este fragmento se ligó después, junto con un adaptador Hind III-Pst I, en pSP72 (tabla 1) creando pSCT-015B. Se ligó después el gen de resistencia a kanamicina en el sitio Pst I de pSCT-015B, creando pSCT-016B. Se delecionaron las regiones 5' codificante y control del gen de la β -lactamasa (resistencia a ampicilina) cortando el vector con Pvu II y Fsp I seguido por religación creando pSCT-017B. El terminador de transcripción T1-T2 de pSP72 T1-T2 (tabla 1) se cortó luego y se ligó en pSCT-017B usando sitios Sal I y Bgl II creando pSCT-018B. El gen LAC-IQ (tabla 1) que contiene sitios Bam HI y Eco RI se ligó después en los sitios Bgl II-Eco RI de pSCT-018B creando pSCT-018D (véanse las figuras 1A y 1B).

Parte II Construcción de pSCT-019

Se insertaron el P/O lac (tabla 1) con sitios Pst I y Hind III y un fragmento Hind III-Eco RI de pSCT-013B (que contenía tac-pelBsCTgly), en una ligación de tres partes, en los sitios Pst I y Eco RI de pSP72 creando pSCT-015A. Como se describe en la construcción de pSCT-017B, se insertó el gen Kan-R y el gen de β -lactamasa se eliminó de pSCT-015A para crear pSCT-016A y pSCT-017A. Se cortó el fragmento lpp-lac-ompAsCTgly (tabla 1) Pst I-Acc I (también están presentes 17 pares de bases de la secuencia codificante 5' de sCTgly) de pSP72-OMPA y se ligó en los sitios compatibles en pSCT-017A para crear pSCT-019 (véase la figura 2).

Parte III Construcción de pSCT-025

Se ligó un fragmento Bam HI del operón lac-ompAsCTgly (tabla 1) amplificado por PCR en el sitio Bam HI de pSCT-018D, sustituyendo el gen pelBsCTgly y creando pSCT-023(-). El (-) significa que el inserto se insertó en la orientación inversa respecto al promotor tac. El operón lac-ompAsCTgly se cortó luego de pSCT-023(-), usando Bam HI y Sal I, después se ligó en los sitios compatibles de pSCT-017B creando pSCT-017 DELTA. El fragmento mayor Bgl I-Bgl II que contenía el gen de resistencia a kanamicina, promotores lac-tac y ompAsCTgly se cortó de pSCT-017 DELTA y se ligó en los sitios Bgl I-Bam HI de pSCT-018D creando pSCT-025 (véase la figura 3).

Parte IV Construcción de pSCT-029A

Un producto de PCR de RRNB T1-T2-O2 (tabla 1), que contenía sitios Xho I y Eco RI, se ligó en los sitios Sal I-Eco RI de pSCT-025 creando pSCT-025A. Un fragmento Hind III-Sac I cortado de pSCT-025, que contenía el cartucho génico con terminadores tac-lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2, se ligó en los sitios compatibles de pSP72 creando pCPM-01. El vector pCPM-01A se construyó usando el mismo método descrito para pSCT-025A. Los plásmidos pSCT-025A y pCPM-01A se diferencian de los plásmidos pSCT-025 y pSCT-01 en los tipos de sitios de restricción presentes en 5' y en 3' del terminador de transcripción RRNB T1-T2. Se cortó un fragmento Xho I-Eco RI, que contenía el cartucho génico con terminadores tac-lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2, de pCPM-01A y se ligó en los sitios Sal I-Eco RI de pSCT-025A creando el vector de expresión digénico pSCT-029A (figura 4). Los métodos usados para crear pSCT-029A se pueden repetir para crear vectores de expresión poligénicos adicionales, como se muestra posteriormente para la construcción de pSCT034.

Parte V Construcción de pSEC-E

El vector pCPM-01 se digirió con Pst I y Xba I para cortar el P/O lac, que se ligó después en los sitios compatibles de pSP72. El gen secE amplificado por PCR (tabla I) que contenía sitios de clonación Xba I y Bam HI se ligó en los sitios compatibles del vector de clonación cistrónico ompAsCTgly T1-T2 (tabla I) creando pCM-SECE. El secE y los terminadores T1-T2 se cortaron de pCM-SECE como un fragmento Xba I-Eco RI y se ligaron junto con un fragmento Xba I-Sal I, que contenía el P/O lac (cortado de pSP72-lac), en los sitios Sal I-Eco RI de pSP72 creando pSEC-E (véase la figura 5).

Parte VI Construcción de pPRLA-4 (prlA-4 es un alelo mutante del gen prlA o secY)

La región terminadora T1-T2 del vector cistrónico ompAsCTgly T1-T2 se cortó usando Bam HI y Sma I, que se ligó después en los sitios Pvu II y Bam HI de pSP72 creando el vector de clonación intermedio PRLA4-INT. El P/O lac se cortó de pSP72-LAC con Xba I y Sac I y se ligó junto con el fragmento de PCR de prlA-4 (tabla I), que contenía sitios de restricción Xba I y Bam HI, en los sitios Sac I-Bam HI de PRLA4-INT creando PRLA-4 (véase la figura 6).

Parte VII Construcción de pSEC-EY

Se subclonó un fragmento oligonucleotídico sintético que contenía la secuencia de P/O trpE (tabla I) en los sitios Xho I-Xba I de pCPM-01A creando pCPM-08. Las secuencias prlA-4 y T1-T2 se cortaron pPRLA-4 con Xba I y Xho I y se ligaron con un fragmento Sal I-Eco RI de pSEC-E, que contenía el operón lac-secE-T1-T2, en los sitios Xba I y Eco RI de pCPM-08 creando pSEC-EY (véase la figura 7).

Parte VIII Construcción de pSCT-037 y pSCT-038

Las regiones codificantes secE y prlA-4 se cortaron de pSEC-EY con Xho I y Bgl II. El fragmento resultante se ligó después en los sitios Sal I-Bgl II de pSCT-025A y pSCT-029A creando pSCT-037 y pSCT-038 respectivamente (véase la figura 8).

Construcción de pSCT-034

pSCT-034 es un plásmido de expresión trigénico que contiene tres copias del casete de transcripción Tac-Lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2. Este vector (véase la figura 9) se construyó insertando el cartucho descrito de pCPM-01A en los sitios Sal I y Eco RI de pSCT-029A añadiendo una tercera copia del cartucho de expresión. El método de construcción es idéntico al método para la construcción de pSCT-029A a partir de pCPM-01A y pSCT-025A. Los sitios Sal I y Eco RI en 3' se vuelven a crear, lo que proporciona los sitios necesarios para añadir más copias del cartucho.

TABLA 1

Fragmento de clonación	Tipo de componente	Origen o molde
pGEM 11 ZF(+)	Plásmido	Promega
pGEX 1N	Plásmido	Pharmacia Biosciences
pSP 72	Plásmido	Promega
Promotor Tac	Bloque de ADN del promotor tac	Pharmacia Biosciences
pelB-sCTgly-cas2*	Gen amplificado por PCR	Gen pelB-sCTgly ensamblado a partir de oligonucleótidos sintéticos
Gen de resistencia a kanamicina	Bloque génico	Pharmacia Biosciences
RRNB T1-T2	Fragmento de PCR	Terminadores de transcripción T1 y T2 del gen de proteína ribosómica de pKK 233-2

pSP72 T1-T2	Subclón	Subclonado a partir del fragmento de PCR anterior en pSP72
Represor lac (LAC-IQ)	Gen amplificado por PCR	Plásmido pGEX 1-N
Promotor/operador (P/O) lac	Fragmento amplificado por PCR	pGEM11ZF+
lpp-lac-ompAsCTgly (parcial)	Producto amplificado por PCR (el cebador 3' de PCR contiene los primeros 17 nucleótidos de sCTgly)	pIN IIIA
pSP 72-ompA	Subclón del fragmento anterior	Subclonado a partir del fragmento de PCR anterior en pSP72
lac-ompAsCTgly	Operón amplificado por PCR	pSCT-019
RRNB T1-T2-O2	Producto amplificado por PCR	pSCT-025
Cistrón OMPASCTGLY T1-T2	Producto amplificado por PCR de ompAsCTgly subclonado en pSP72 T1-T2	pSCT-025 (molde)
SEC E	Gen amplificado por PCR	ADN genómico de <i>E. coli</i> WA 837
PRLA-4	Gen amplificado por PCR	Gen prlA 4 de <i>E. coli</i> del vector pRLA41++
P/O TRP	Gen de oligonucleótidos sintético ensamblado	Secuencia del promotor/operador de triptófano E de <i>E. coli</i> de la bibliografía

* pelB – secuencia señal del gen de la peptidato liasa B de *Erwinia carotovora*

++ El vector pRLA41 fue proporcionado por Tom Silhavy en la Universidad de Princeton. El alelo mutante prlA-4 puede tener propiedades que permitan una translocación más fácil de péptidos y proteínas heterólogas. Sin embargo, el gen natural prlA (secY) también debe funcionar.

Transformación de *E. coli* BRL con pSCT-029A o pSCT-038

Después de construir los plásmidos pSCT-029A o pSCT-038, es decir, ligación de varios fragmentos de ADN, es necesario usar la mezcla final de ligación para transformar una cepa huésped de *E. coli* para la propagación del plásmido o para futuros trabajos de expresión de proteínas. Para realizar esta transformación es necesario producir que las células de *E. coli* sean competentes para recibir el ADN. La preparación de células competentes se puede hacer por una variedad de métodos tales como tratamiento con CaCl_2 y electroporación. Para la preparación final de las líneas celulares preferidas, UGL 165 y UGL 703, se usaron ambos métodos en serie según los siguientes protocolos.

I. Transformación primaria en el huésped *E. coli* K-12, BB4

Esta primera transformación no es esencial, pero se prefiere ya que el huésped *E. coli* BB4 K-12 tiene una alta eficiencia de transformación lo que produce un gran número de transformantes y una alta probabilidad de identificar una variedad de clones deseados.

A. Preparación de células BB4 competentes mediante tratamiento con CaCl_2

Genotipo BB4... LE392.32 [F' lacI^QZΔMI5proAB Tn 10 (Tet^R)]

1. Preparar un cultivo saturado durante la noche de la célula huésped.
2. Preparar un cultivo reciente de célula huésped inoculando 100 ml de medio al 0,5% (v/v) y cultivar hasta una A_{600} nm de 0,02-0,03.
3. Hacer crecer el cultivo hasta una A_{600} nm de 0,15-0,3, aproximadamente 3 duplicaciones.
4. Almacenar las células en hielo durante 10 minutos.
5. Eliminar las células del medio de cultivo mediante centrifugación, 5K rpm x 10 min.
6. Resuspender las células precipitadas en 0,5 volúmenes de CaCl_2 0,1 M helado, almacenar en hielo durante 30 minutos, después precipitar las células como se ha descrito anteriormente.
7. Resuspender las células precipitadas en 0,1X volúmenes de CaCl_2 0,1 M; almacenar en hielo durante 1 hora antes de usar.

B. Protocolo de transformación

1. A 100 ul de células competentes preparadas como se ha descrito añadir 1-2 ul de una mezcla de ligación que idealmente debe contener 2-10 ng de ADN del vector plásmido.
2. Almacenar la mezcla en hielo durante 30 minutos.
3. Dar un choque térmico a la mezcla colocándola en un bloque calentador o un baño de agua a 37°C.
4. Añadir a la mezcla 1 ml de medio de cultivo precalentado e incubar la mezcla a 37°C durante 30-60 minutos.

- Extender una cantidad apropiada de mezcla de transformación sobre un medio sólido apropiado que contiene el antibiótico de selección necesario e incubar las placas 18-24 horas hasta que aparezcan colonias.

II. Transformación secundaria

Se identifican los transformantes por una variedad de métodos. Se eligen varios clones para transferir al segundo huésped, la cepa huésped B de *E. coli*, BLR. BLR es la cepa huésped de elección o fermentación y expresión de proteínas.

El genotipo de BRL es $F^- \text{ompT hsdS}_B(r_B^- \cdot m_B^-) \text{gal dcm } \Delta(\text{srl-recA}) 306::\text{Tn10}(\text{Tc}^R)$. Las células de *E. coli* aceptarán ADN después de ser expuestas a un campo eléctrico en condiciones controladas y específicas. Las cepas huésped B de *E. coli* se transforman más fácilmente con un plásmido intacto, más que con una mezcla de ligación, y son más receptivas a ADN exógeno cuando se hacen competentes mediante electroporación más que mediante tratamiento con CaCl_2 .

A. Preparación de células competentes *E. coli* BLR para posterior electroporación

- Preparar un cultivo saturado durante la noche de la célula huésped.
- Preparar un cultivo reciente de célula huésped inoculando 100 ml de medio al 1,0% (v/v) y cultivar hasta una $A_{600 \text{ nm}}$ de 0,3-0,5.
- Recoger las células mediante centrifugación después de enfriar el cultivo en hielo durante 15 minutos.
- Decantar el sobrenadante, eliminando tanto medio como sea posible. Resuspender las células en un volumen total de 100 ml de glicerol acuoso al 10% helado, peso/volumen (el glicerol debe ser de alta calidad extra). Volver a centrifugar las células resuspendidas inmediatamente.
- Resuspender las células en 50 ml de glicerol al 10% helado (p/v). Volver a centrifugar.
- Resuspender las células en 25 ml de glicerol al 10% helado (p/v). Volver a centrifugar.
- Repetir el paso 6.
- Resuspender las células en un volumen final de 2 ml de glicerol al 10% helado (p/v). La concentración final de células debe ser $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. Las células se pueden almacenar hasta 1 año a -80°C .

B. Transformación mediante electroporación

- Incubar cubetas estériles y el soporte deslizante blanco durante 10 minutos en hielo. Incubar también varios tubos de polipropileno en hielo.
- Mezclar 40 μl de suspensión de células con 1-2 μl de solución que contiene ADN de plásmido en Tris/EDTA a una concentración aproximada de 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$. (La mezcla de ADN debe tener tan poca sal como sea posible para prevenir la formación de arco eléctrico del equipo). Mezclar la solución bien e incubar en hielo durante 0,5-1,0 minutos.
- Ajustar el aparato Gene-Pulser a 25 μF . Ajustar la resistencia del controlador de pulso a 200 ohmios. Ajustar el aparato Gene-Pulser a 2,5 kV con cubetas de 0,2 cm o 1,5-1,8 kV cuando se usan cubetas de 1,0 cm. Transferir la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación fría y agitar la suspensión al fondo de la cubeta eliminando todas las burbujas de aire. Colocar la cubeta en el soporte deslizante de seguridad helado y empujar el soporte deslizante en la cámara hasta que la cubeta se asiente entre los contactos en la base de la cámara.
- Pulsar la cubeta una vez por encima del ajuste.
- Inmediatamente añadir 1 ml de medio tamponado SOC (20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl , 1 l de H_2O y glucosa 20 mM) a la cubeta, resuspender las células.
- Transferir la suspensión a un tubo de polipropileno estéril de 17 x 100 mm e incubar a 37°C durante 1 hora.
- Sembrar la mezcla electroporada en placas con medio selectivo.

Producción de sCTgly (Fermentación)

Se prepara el medio de fermentación en lotes usando los componentes enumerados en la tabla 2. La fermentación se inocula con un cultivo en fase logarítmica tardía cultivado en medio de inoculación (tabla 2). El volumen de inoculación se determina por la cantidad de inóculo (número de células) necesario para alcanzar una A inicial a 600 nm en el fermentador entre 0,015 y 0,24. Los parámetros de pH, DO_2 y temperatura para la carrera de fermentación se enumeran en la tabla 3. El estado de lote alimentado de la fermentación se inicia cuando el glicerol en el medio en lotes se agota. [El agotamiento de glicerol se puede determinar por un pico en el oxígeno disuelto y/o un ensayo de glicerol]. La velocidad de alimentación se ajusta para mantener una velocidad de división celular constante basada en la masa celular (peso celular seco) en el momento del agotamiento del glicerol. Los componentes de la alimentación se enumeran en la tabla 2. La velocidad de alimentación se basa en la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{(V) \times (MU) \times (\text{pcs}) \times e^{Mu+1}}{(Yx/sx[\text{Alimentación}])}$$

donde:

Mu = velocidad de crecimiento (en duplicaciones por hora)

pcs = peso celular seco en gramos por litro de medio al inicio de la alimentación determinado empíricamente para cepas individuales de *E. coli*

t = tiempo en horas

Y x/s constante de utilización de glicerol para el huésped (0,327 para *E. coli* WA 837; similar para BLR)

v = volumen de fermentación en litros

[alimentación] = gramos de glicerol por litro de medio de alimentación (629 gramos por litro usados en todos los ejemplos descritos aquí)

Q = velocidad de alimentación de glicerol, litros/hora

El proceso de inducción se logra usando una inducción en gradiente acoplada a la velocidad de alimentación que aumenta el inductor (IPTG) durante el tiempo en concordancia con la velocidad de crecimiento ajustada.

El progreso de la fermentación se controla midiendo la absorbancia a 600 nm, peso celular húmedo en g/l, además del análisis de la presencia y concentración de sCTgly en mg/l por cromatografía de CEX de muestras del medio.

Se puede añadir glicina a la fermentación para aumentar la permeabilidad de la membrana externa. Se puede añadir glicina al medio en lotes o a la alimentación.

Preferiblemente, la glicina se añade a la alimentación de modo que la concentración de glicina en el cultivo de fermentación aumente con la velocidad de crecimiento celular. La concentración óptima de glicina debe estar en el intervalo de 0,1-1 gramos por 100 ml en el tiempo final de la fermentación. En la práctica, la cantidad de glicina añadida a la fermentación se calcula de modo que se alcance la concentración deseada de glicina al final de la fermentación. La cantidad real de glicina añadida depende de la duración de la fermentación en tiempo, después de la inducción y la concentración final de glicina deseada. Los métodos que se han usado: se añadieron 24 g/l de glicina a la alimentación de fermentación, lo que produce una concentración final de glicina de 5 g/l 26 después de la inducción. Se ha determinado que añadir glicina a la alimentación es más eficaz que añadir glicina al medio en lotes.

Tabla 2. Lista de componentes de los medios.

Medio de inoculación		Medio por lotes		Medio de alimentación	
Componentes	Cantidad g/l	Componentes	Cantidad g/l	Componentes	Cantidad g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,00	(NH ₄) ₂ SO ₄	14,80	Glicerol	629
KH ₂ PO ₄	2,00	KH ₂ PO ₄	4,40	IPTG	2,80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,10		
CaCl ₂	0,25	CaCl ₂	0,53		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,11		
Citrato de sodio	1,50	Citrato de sodio	2,20		
N-Z caso +	5,00	N-Z caso +	10,60		
Hy levadura 412	2,00	Hy levadura 412	3,10		
L-metionina	4,50	L-metionina	4,50		
Kanamicina	0,05	Kanamicina	0,05		
Glicerol	18,00	Glicerol	2,50		

Tabla 3. – Condiciones determinadas para los parámetros de fermentación

Parámetro	Lo más preferido	Preferido	Bueno
pH	6,78-6,85	6,50-7,00	6,00-7,5
Temperatura °C	29,5-30,5	28,0-32,0	20,0-35,0
DO (saturación de oxígeno)	>80%	>70%	>50%
Valor de Mu	0,12-0,14	0,10-0,16	0,05-0,20
Tiempo de fermentación (horas después de la inducción)	24-27	22-29	20-32

Aislamiento de sCTgly

El medio condicionado se recoge mediante la separación de las células del medio usando filtración de flujo tangencial o centrifugación para recoger el medio y descartar las células. La sCTgly excretada se estabiliza en medio añadiendo HCl 2,0 N hasta un pH final de 3,0. La calcitonina de salmón extendida con glicina es estable durante periodos prolongados de tiempo a pH 3,0. Después de la eliminación de las células y la estabilización por pH, el péptido se purifica usando métodos de cromatografía de intercambio catiónico y de fase inversa. Mientras que la cromatografía de fase inversa seguida por cromatografía de intercambio catiónico puede proporcionar una buena

purificación, se prefiere que también se incluya un paso inicial de intercambio catiónico antes de la cromatografía líquida de fase inversa. Para purificaciones grandes, esto reduce el volumen que se va a someter a cromatografía de fase inversa, lo que disminuye así los problemas medioambientales y de seguridad surgidos por la necesidad de usar grandes volúmenes de solventes orgánicos tal como acetonitrilo.

Otra modificación preferida es la S-sulfonación de los residuos de cisteína del péptido calcitonina de salmón antes de o durante la purificación para mejorar los rendimientos del péptido monomérico.

Descripción de clones

El clon monogénico UGL 172 es una cepa huésped de *E. coli* BLR que contiene el vector pSCT-025A que comprende un casete de transcripción (monogénico) que codifica la calcitonina de salmón con una glicina terminal (sCTgly)². El clon digénico UGL 165 es una cepa huésped de *E. coli* BLR que contiene el vector pSCT-029A que comprende dos casetes en tándem (digénico) que codifica cada uno calcitonina de salmón con una glicina C-terminal (sCTgly). El clon trigénico UGL 168 es una cepa de *E. coli* BLR que contiene el vector pSCT-034 que comprende tres casetes en tándem (trigénico) que codifica cada uno calcitonina de salmón con una glicina C-terminal (sCTgly). El clon monogénico UGL 702 es una cepa de *E. coli* BLR que contiene el vector pSCT-037 que comprende 1 casete de transcripción y genes de factor de secreción. El clon digénico UGL 703 es una cepa de *E. coli* BLR que contiene el vector pSCT-038 que comprende 2 casetes de transcripción en tándem y genes de factor de secreción.

Ejemplo 1. – Fermentación de UGL 165 a escala de 1 L

La fermentación del clon UGL 165 se llevó a cabo como se describe en Detalles experimentales. La tabla 4 resume los parámetros y resultados de la fermentación. Brevemente, se cultivaron células del clon UGL 165 en medio de inoculación y se usaron para sembrar un fermentador que contenía un 1 litro de medio en lotes para dar una A₆₀₀ nm inicial de 0,06. Las células se hicieron crecer durante 6,25 horas hasta que el glicerol en el medio se agotó. Después, se inició la fase en lote de alimentación de la fermentación y se suplementó continuamente con el medio de alimentación durante 25,5 horas. Las condiciones al tiempo cero (inicio de la alimentación e inducción) fueron como sigue: saturación de oxígeno, 94%; temperatura 30°C; y pH 6,8. Las condiciones al final de la fermentación (tiempo 25,5 horas) fueron como sigue: saturación de oxígeno, 40%; temperatura 31°C; y pH 6,8. Además, al final de la fermentación, la absorbancia a 600 nm era igual a 113,3 y el peso celular húmedo en g por litro era 168 g. La producción de sCTgly al final de la fermentación también se midió que era 222 mg/litro de medio (véase la figura 10 y la tabla 4).

Tabla 4 – Resumen de fermentación de UGL 165

Tiempo, Horas tras alimentación	A ₆₀₀ nm	Peso celular húmedo g/l	sCTgly mg/l**	Volumen de alimentación añadido, ml	[IPTG] uM	Agitación RPM
-6,25	0,06	--	--	--	--	500
0***	11,1	--	--	--	--	1300
15	51,7	83,3	sin ensayar	44,1	528	1000
17	48,7	92,3	sin ensayar	51,3	614	1200
19	53,6	100,5	38	78,2	948	1300
21	67,6	117,3	77	104,8	1256	1300
22	86,7	130,9	111	120,4	1442	1350
23	92,6	140,0	104	138,2	1654	1350
24	106,5	153,7	156	158,4	1896	1350
25	108,5	162,8	183	181,2	2174	1400
25,5	113,3	168	222	194,1	2324	1400

** sCTgly determinada usando el ensayo CEX-HPLC como se describe en el ejemplo 4.

*** Agitación subida a 1450 rpm durante la noche a las dos horas después de empezar la alimentación.

Ejemplo 2 – Fermentación de UGL 703 a escala de 1 L

Se ha depositado *E. coli* recombinante UGL 703 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como ATCC 98395 según lo estipulado en el Tratado de Budapest respecto al depósito de microorganismos con fines de procedimiento de patentes. La fermentación del clon UGL 703 se llevó a cabo como se describe en Detalles

² Un casete de transcripción preferido contiene el promotor dual tac/lac seguido por un sitio de unión a ribosomas seguido por secuencias para el péptido señal OmpA seguido por secuencias para sCTgly seguido por las secuencias de terminación transcripcional rrnB T1-T2.

experimentales. La tabla 5 resume las condiciones de esta fermentación. Brevemente, el clon UGL 703 se cultivó en medio de inoculación y se usó para sembrar un fermentador que contenía un 1 litro de medio de lotes para dar una A_{600} nm inicial de 0,06 (la preferencia es de 0,06 a 0,12). Las células se hicieron crecer durante 6,25 horas (el intervalo preferido es desde 6,0 hasta 7,0 horas) hasta que el glicerol en el medio se agotó. Después, se inició la fase en lote alimentado de la fermentación y se suplementó continuamente con el medio de alimentación durante 26 horas. Las condiciones al tiempo cero (inicio de la alimentación e inducción) fueron como sigue: saturación de oxígeno, 95%; temperatura 30°C; y pH 6,8. Las condiciones al final de la fermentación (tiempo 26 horas) fueron como sigue: saturación de oxígeno, 80%; temperatura 31°C; y pH 6,8. Además, al final de la fermentación, la absorbancia a 600 nm era igual a 80,9 y el peso celular húmedo en gramos por litro era 129,1 g. También se midió que la producción de sCTgly era de 284 mg/litro de medio (véase la figura 11 y la tabla 5).

Tabla 5 – Resumen de fermentación de UGL 703

Tiempo	A 600	Peso celular húmedo g/l	sCTgly mg/l**	Volumen de alimentación añadido ml	[IPTG] uM	Agitación RPM
-6,5	0,06	--	--	--	--	500
0	8,1	--	--	--	--	1300
15,5	22,6	7,3	~18	47,5	570	1150
19	36,5	83,1	25	72,9	948	1250
21	53,5	94,2	53	104,8	1256	1350
22	61,3	100,8	58	120,4	1442	1450
23	59,7	106,0	69	138,2	1654	1550
24	73,3	119,0	83	158,4	1898	1580
25	74,1	119,1	203	181,1	2174	1620
26	80,9	129,1	284	207,6	2487	1620

** sCTgly determinada usando el ensayo CEX-HPLC como se describe en el ejemplo 4.

Conclusiones

Se llevaron a cabo otros experimentos en condiciones globales similares usando los clones UGL 172, UGL 168 y UGL 702. Las figuras 12 y 13 indican que el clon digénico UGL 165 es el más adecuado para la producción de sCTgly siendo el segundo mejor el clon trigénico UGL 165 sobre el clon monogénico UGL 173. Sin embargo, la producción de sCTgly por UGL 165 aún se puede mejorar en presencia de factores de secreción coexpresados (UGL 703) (compárense las figuras 10 y 11 y 17).

Con respecto a la saturación de oxígeno durante la fermentación, las figuras 14A y 14B apoyan la conclusión de que el oxígeno añadido en el medio de fermentación no es crítico para el crecimiento celular del UGL 165 pero es muy importante en aumentar la producción de sCTgly.

Las figuras 15A, 15B y 16 indican claramente que la cepa de *E. coli* BLR es la más adecuada para la producción de sCTgly.

La producción de sCTgly se puede aumentar todavía más mediante la adición de glicina como un componente de alimentación añadido.

Ejemplo 3 – Purificación de sCTgly a partir de medio de cultivo de UGL 165: Cromatografía de intercambio catiónico #1:

Aproximadamente 1000 L de medio de cultivo que se habían recogido por filtración de flujo tangencial o centrifugación se acidificaron con un volumen suficiente de ácido clorhídrico 2 N para disminuir el pH a 3,0. El medio se diluyó posteriormente con un volumen suficiente de agua para disminuir la conductividad a 7,5 mS. El medio diluido se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Pharmacia SP-Sepharose Big Beads, 99,0 cm x 13,0 cm) que se había equilibrado con ácido cítrico 10 mM pH 3,0 a una velocidad de flujo de 25 l/min (3,25 cm/min). Después de completar la carga, la columna se lavó con ácido cítrico 10 mM pH 3,0 a 8 l/min (1,0 cm/min) durante aproximadamente 40 minutos (3 volúmenes de lecho) o hasta que se alcanzó un nivel basal de UV estable. El producto (sCTgly) se eluyó con ácido cítrico 10 mM, cloruro de sodio 350 mM pH 3,0 a una velocidad de flujo de 8 l/min (1,0 cm/min). La columna se limpió y desinfectó con hidróxido de sodio 0,5 M, cloruro de sodio 1,0 M durante 60,0 minutos (5,0 volúmenes de lecho) a 8 l/min (1,0 cm/min).

A un tanque con agitación que contenía el eluato resultante de CEX#1 (aproximadamente 100 L) se añaden 60,57 gramos de trometamina. La solución se agita hasta que todos los sólidos se disuelven. El pH de la solución se ajusta a 8,25 [intervalo: de 8,0 a 8,5] usando NaOH 2 M. Se añaden 23,64 gramos de TRIS-HCl (clorhidrato de Tris[hidroximetil]aminometano) y se agita hasta que todos los sólidos se disuelven. Se añaden una solución de 1,0

kg de sulfito de sodio disuelto en TRIS·HCl y una solución de 200 gramos de tetratiónato de sodio disuelto en TRIS·HCl al tanque con agitación. La reacción se deja agitar durante 15 minutos. Si es necesario, el pH se ajusta a 8,25 [intervalo: de 8,0 a 8,5] con NaOH 2 M. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 2,25 [intervalo: de 2,0 a 2,5] con HCl 2 M.

Cromatografía de fase inversa #1 (RP #1):

La mezcla de reacción de S-sulfonación resultante (aproximadamente 100 L) se cargó directamente en una columna de fase inversa (Toso Haas Amberchrom CG300md, 25,0 cm x 18,0 cm) que se había equilibrado con ácido trifluoroacético al 0,1% a 2,0 l/min (4,0 cm/min). Después de completar la carga, la columna se lavó con ácido trifluoroacético al 0,1% a 750 ml/min (1,5 cm/min) hasta que se alcanzó un nivel basal de UV estable. La columna se lavó con ácido trifluoroacético al 0,1%, acetonitrilo al 20% a 750 ml/min (1,5 cm/min) hasta que el pico del contaminante principal eluyó por completo. El producto (sCTgly) se eluyó con ácido trifluoroacético al 0,1%, acetonitrilo al 40% a 750 ml/min (1,5 cm/min). La columna se limpió con ácido trifluoroacético al 0,1%, acetonitrilo al 80% durante 30 minutos a 750 ml/min (1,5 cm/min).

Cromatografía de intercambio catiónico #2 (CEX #2):

El eluato resultante de RP #1 (aproximadamente 8,0 L) se cargó directamente en una columna de intercambio catiónico (E. Merck Fractogel EMD SO3 650M, 18,0 cm x 24 cm) que se había equilibrado con MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 25 mM pH 5,8 a 500 ml/min (2,0 cm/min). Después de completar la carga, la columna se lavó a 750 ml/min (3,0 cm/min) con MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 25 mM pH 5,8 hasta que el efluente de la columna volvió a pH 5,8 [intervalo: 5,6-5,9]. La columna se lavó con MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 25 mM pH 5,8 durante 30 minutos adicionales a 750 ml/min (3,0 cm/min) para eliminar los contaminantes peptídicos principales. El producto (sCTgly) se eluyó con MES 25 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 5,8 a 750 ml/min (3,0 cm/min). La fracción de producto se ajusta a pH 3,0-5,0 con HCl 1,0 M a menos que la amidación siga inmediatamente. La columna se limpió y desinfectó con hidróxido de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 1,0 M durante 60 minutos a 750 ml/min (3,0 m/min).

Reacción de amidación

El eluato de CEX #2 con el pH ajustado resultante contiene sCTgly purificado que es una solución de sustrato adecuada para su uso en la conversión *in vitro* de sCTgly a calcitonina de salmón auténtica, una reacción catalizada por la enzima peptidil glicina α -amidante (PAM) como se muestra posteriormente en el ejemplo 5.

Ejemplo 4

HPLC analítica de intercambio catiónico para la cuantificación de sCTgly:

Se identificó y cuantificó sCTgly en las fracciones cromatográficas recogidas mediante CEX-HPLC analítica. Se cargó una alícuota de cada fracción en una columna de intercambio catiónico (The Nest Group, polisulfotetraspartamida, 4,6 mm x 50 mm) que se había equilibrado con fosfato de sodio 10 mM pH 5,0 a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. La separación se alcanzó realizando un gradiente lineal de fosfato de sodio 10 mM pH 5,0 hasta fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 250 mM pH 5,0 a 1,2 ml/min durante 15 minutos. El efluente de la columna se siguió por absorbancia de UV a 220 nm. Se identificó sCTgly por comparación de su tiempo de retención con el del patrón de referencia de sCTgly purificada. Se cuantificó sCTgly por el área del pico comparado con el patrón de referencia de sCTgly. Este método analítico también se usó para cuantificar sCTgly del medio de fermentación.

Ejemplo 5 – Conversión de calcitonina de salmón extendida con glicina a calcitonina de salmón auténtica usando enzima α -amidante

Para obtener los rendimientos óptimos de calcitonina de salmón amidada, se observan los siguientes parámetros críticos:

- 1) La reacción de amidación se lleva a cabo en un recipiente de vidrio silanizado para prevenir la adsorción no específica del péptido al recipiente de reacción.
- 2) Se mantiene un nivel alto de oxígeno disuelto en la mezcla de reacción por burbujeo y/o agitación. Preferiblemente, el nivel de oxígeno disuelto es $\geq 75\%$.
- 3) La temperatura de incubación durante la amidación se mantiene entre 35°C-39°C.
- 4) El pH de la reacción de amidación se mantiene entre 6,0 y 6,5.
- 5) La concentración inicial de calcitonina de salmón extendida con glicina en la reacción de amidación debe ser entre 3,5-10,5 mg/ml (de 0,95 mM a 2,9 mM).
- 6) Cuando se añaden de 12.000-24.000 unidades/ml de enzima α -amidante (peptidil glicina α -amidante monooxigenasa, denominada en el presente documento como "PAM") sustancialmente sin proteasas a la mezcla de reacción y la concentración de sustrato es como se indica en 5) anteriormente, la reacción se deja

seguir durante 4-6 horas. Sin embargo, el tiempo de reacción se puede aumentar adicionalmente hasta 24 horas sin efectos perjudiciales para el producto.

- 7) Para prevenir que la reacción de amidación se vuelva limitante por ascorbato, se añade un equivalente adicional de ascorbato aproximadamente a mitad de la reacción.

Los componentes de la mezcla de reacción de amidación son los siguientes:

- 3,5-10,5 mg/ml de calcitonina de salmón extendida con glicina, S-sulfonada
- Tampón MES 30 mM, pH 6,0-6,5
- CuSO_4 de 0,5 a 1,0 μM (por ejemplo 0,5)
- KI 4-15 mM (por ejemplo, 5)
- Etanol del 1-5% (por ejemplo, al 1%)
- Catalasa 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (por ejemplo, 35)
- Ascorbato 1,5-3,0 mM (por ejemplo, 1,5)
- peptidil glicina α -amidante monooxigenasa (12.000-24.000 unidades por ml de mezcla de reacción. 1 unidad es la conversión de 1 picomol por minuto de sustrato dansil-Tyr-Val-Gly a producto a 37°C a pH 7). La enzima PAM se puede obtener como se describe en Miller et al., ABB 298: 380-388 (1992), patente de EE UU 4.708.934, publicaciones europeas 0 308 067 y 0 382 403 y Biotechnology Vol. II (1993) pp. 64-70, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento mediante referencia.

La calcitonina de salmón extendida con glicina se puede producir mediante fermentación como se describe en el ejemplo 1 o el ejemplo 2 y purificar como se describe en el ejemplo 3 antes de la amidación.

En casos donde la enzima usada para la amidación es la peptidil glicina α -hidroxilante monooxigenasa (PHM), se usa la misma mezcla de reacción que la descrita anteriormente, sustituyendo PHM por PAM. Además, al final del periodo de incubación de 4 a 6 horas, el pH de la reacción se sube mediante la adición de base a entre 8 y 9. La mezcla de reacción se agita durante 4 a 8 horas adicionales antes de terminar la reacción. La peptidil glicina α -hidroxilante monooxigenasa se puede obtener expresando solo la parte N-terminal de PAM (aproximadamente los primeros 40 kDa). Véase, por ejemplo, Mizuno et al. BBRC Vol. 148, No. 2, pp. 546-52 (1987) cuya divulgación (según se refiere a "AE 1" de Mizuno se incorpora al presente documento por referencia. Se sabe que la piel de rana expresa PHM de forma natural.

Después de haber terminado la reacción de amidación, la reacción se diluye con suficiente agua para llevar la concentración final de péptido a menos de 3,0 mg/ml. Se añade suficiente TRIS pH 9,0 a la mezcla para llevar la concentración final de TRIS a aproximadamente 100 mM. Si es necesario, el pH se ajusta a [de 8,0 a 9,0] con NaOH 2 M. Se añade lentamente con agitación un exceso de 3,0 veces de L-cisteína, sobre la concentración final (mM) de $\text{SO}_3\text{-sCT}$, a la mezcla de reacción. Si es necesario, el pH se ajusta a [de 8,0 a 8,5] con NaOH 2 M. La reacción de renaturalización se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante acidificación con ácido fosfórico al 10% hasta pH 2,0 [de 1,9 a 2,3].

Ejemplo 6 – Purificación tras la amidación

Cromatografía de intercambio catiónico #3 (CEX #3): Esta columna se usa para purificar sCT después de la amidación y renaturalización. El contaminante principal después de la amidación/renaturalización es sCTG. La cromatografía CEX #3 emplea una columna Amicon Vantage-A (18,0 x 16,0 cm) empaquetada con resina Toyopearl SP650S. La operación de la unidad se alcanza usando agua para inyección (WFI) y soluciones de cloruro de sodio 0,5 M, 50 mM y 175 mM junto con fosfato de sodio 150 mM pH 5,5. Sigue una breve descripción de los pasos del proceso:

- 1) La velocidad de flujo operacional se ajusta a 750 ml/min.
- 2) Los siguientes parámetros que se usan para seguir la cromatografía se ajustan usando un controlador de sistema LC:
Longitud de onda de UV 230 nm
Intervalo 0,64 AUFS
Conductividad x1000
- 3) La columna se lava inicialmente con WFI durante al menos 5 minutos a una velocidad de flujo de 750 ml/min.
- 4) La bomba de dilución (fosfato de sodio 150 mM pH 5,0) se ajusta a 50 ml/min y la columna se equilibra con fosfato de sodio 10 mM a una velocidad de flujo de 750 ml/min hasta que se observa un nivel basal de pH estable.
- 5) La columna se reequilibra con fosfato de sodio 10 mM a una velocidad de flujo de 750 ml/min hasta que se alcanza una nivel basal estable de pH por debajo de 6,0. (Nota: Si el pH de la columna no está por debajo de 6,0 entonces se requiere un lavado con fosfato de sodio 150 mM). Si se realiza el lavado con fosfato de sodio 150 mM la columna se debe reequilibrar usando fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 antes de pasar al siguiente paso.
- 6) Después de reequilibrar, la columna se somete a una elución blanco con cloruro de sodio 175 mM; fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 750 ml/min.

- 7) La columna se reequilibra con fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 a una velocidad de flujo de 750 ml/min hasta que se alcanza un nivel basal de pH estable.
 - 8) Una vez que se alcanza el equilibrio, se ajusta el pH a 3,5 de la producción amidada/renaturalizada que contiene 10-25 gramos de sCT usando hidróxido de sodio 2 N y se carga en la columna de CEX #3 a 400 ml/min. A la carga de la muestra la sigue el enjuague del envase de carga con 500 ml de WFI.
 - 9) Después de la carga la columna se lava con fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 a una velocidad de flujo de 750 ml/min durante 30 minutos o hasta que el pH de la columna se estabiliza por encima de 5,0.
 - 10) Una vez que el pH de la columna se ha estabilizado por encima de 5,0 la columna se lava, a 750 ml/min, con cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 durante 100 minutos o hasta que el surge el pico de sCTgly.
 - 11) Una vez que han pasado los 100 minutos del cloruro de sodio 175 mM se une al sistema. La columna se lava con cloruro de sodio 175 mM, fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 a una velocidad de flujo de 750 ml/min y el producto eluye. Se recoge el pico entero del producto en un envase. Se determina el peso del material de producción de CEX3 y se añade ácido acético 1 N (el 10% del peso de la fracción) a la fracción.
 - 12) La columna se limpia con cloruro de sodio 0,5 M, fosfato de sodio 10 mM pH 5,5 a una velocidad de flujo de 750 ml/min durante 15 minutos.
 - 13) Una vez que la columna se ha limpiado con cloruro de sodio 1,0 M/hidróxido de sodio 0,25 N se une al sistema. La bomba de dilución se ajusta a 0,000 ml/min y la columna se lava con cloruro de sodio 1,0 M/hidróxido de sodio 0,25 N a una velocidad de flujo de 600 ml/min durante al menos 30 minutos.
 - 14) La columna se lava con WFI durante 5 minutos a una velocidad de flujo de 750 ml/min.
 - 15) La columna se lava con hidróxido de sodio 10 mM a una velocidad de flujo de 500 ml/min durante al menos 30 minutos. La columna se almacena en estas condiciones.
- Cromatografía de fase inversa (RP #2): Este paso sigue a CEX #3 y se usa como un paso de intercambio de sal y tampón antes de la liofilización. El objetivo principal del paso es intercambiar la sal con acetato. La cromatografía RP #2 emplea una columna Amicon Vantage-A (13,0 x 12,5 cm) empaquetada con resina Amberchrom CG300md. La operación de la unidad se alcanza usando agua para inyección, alcohol etílico, acetato de sodio 250 mM y ácido acético al 0,5%. Sigue una breve descripción de los pasos del proceso:
- 1) El eluato de CEX #3 (aproximadamente 4 litros) se acidifica a pH 2,0 con ácido fosfórico y después se diluye con 3 volúmenes iguales de solución de acetato de sodio 33 mM y se deja reposar durante al menos una hora.
 - 2) La velocidad de flujo se ajusta a 320 ml/min mientras que la bomba de dilución (ácido acético al 0,5%) se ajusta a 80 ml/min para una velocidad de flujo operacional global de 400 ml/min.
 - 3) Los siguientes parámetros que se usan para seguir la cromatografía se ajustan usando un controlador de sistema LC:
Longitud de onda de UV 230 nm
Intervalo 2,54 AUFS
Conductividad x 1000
 - 4) La columna se lava inicialmente con ácido acético al 0,1% a una velocidad de 400 ml/min hasta que se observa un nivel basal de conductividad estable.
 - 5) La columna se limpia con alcohol etílico al 80%, ácido acético al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 ml/min hasta que se observa un nivel basal de pH estable.
 - 6) La columna se lava con ácido acético al 0,1% hasta que se observa un nivel basal de pH estable.
 - 7) Después del lavado, se realiza una prueba de columna para seguir la limpieza de la columna. La columna se somete a una elución blanco con alcohol etílico al 40%; ácido acético al 0,1% durante 6 minutos a una velocidad de flujo de 400 ml/min. El eluato recogido de la prueba de la columna se somete a QC para pruebas analíticas.
 - 8) La columna se lava con ácido acético al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 ml/min hasta que se observa un nivel basal de conductividad estable.
 - 9) Tras completar el lavado, el WFI se desconecta de la entrada y se conecta el acetato de sodio 250 mM. La bomba de dilución se ajusta a 0,000 ml/min. La columna se equilibra con acetato de sodio 250 mM a una velocidad de flujo de 400 ml/min hasta que se observa un nivel basal de pH estable.
 - 10) Una vez que se ha alcanzado el equilibrio, el eluato de CEX #3 se carga en la columna de RP #2 a 400 ml/min. A la carga de la muestra la sigue el enjuague del envase de carga con 1,0 litro de acetato de sodio 250 mM.
 - 11) La columna se lava usando acetato de sodio 250 mM a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante 60 minutos.
 - 12) Después del lavado con acetato de sodio, el acetato de sodio se desconecta de la entrada y se conecta el WFI. La bomba de dilución se vuelve a una velocidad de flujo de 80 ml/min y la columna se lava con ácido acético al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante 25 minutos.
 - 13) Después del lavado con ácido acético al 0,1%, el producto se eluye usando alcohol etílico al 40%, ácido acético al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 ml/min. Se recoge el pico entero del producto y se somete a liofilización para dar polvo de sCT purificada.
 - 14) La columna se limpia con alcohol etílico al 80%, ácido acético al 0,1% a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante al menos 20 minutos.

- 5
- 10
- 15) Después de la limpieza, la bomba de dilución se ajusta a 0,000 ml/min y la columna se lava con WFI a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante al menos 5 minutos.
 - 16) Después del lavado con WFI, el WFI se desconecta de la entrada y se conecta hidróxido de sodio 0,5 N. La columna se lava con el hidróxido de sodio 0,5 N a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante al menos 20 minutos.
 - 17) El hidróxido de sodio 0,5 N se desconecta del sistema y se conecta el WFI. La columna se lava con alcohol etílico al 50% a una velocidad de flujo de 400 ml/min durante al menos 20 minutos. La columna se almacena en estas condiciones.
 - 18) El eluato de RP #3 se almacena a de 2 a 8°C.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producir un péptido amidado que comprende:

(a) cultivar células huésped de *E. coli* que comprenden un vector de expresión que comprende dos casetes de transcripción, en donde cada uno de dichos casetes de transcripción comprende:

(i) una región codificante con ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico acoplado en el mismo marco de lectura en 3' de ácidos nucleicos que codifican un péptido señal; y

(ii) una región control operativamente unida con la región codificante, dicha región control comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión a ribosomas, en donde al menos uno de dichos promotores es tac,

en donde dichas células huésped expresan un producto peptídico que tiene una glicina C-terminal junto con un péptido señal N-terminal en condiciones en donde el crecimiento de dichas células huésped se controla para que esté dentro de un intervalo de 0,05 a 0,20 duplicaciones por hora; en donde el cultivo se induce durante parte del periodo de dicho crecimiento controlado;

(b) recuperar dicho producto peptídico del medio de cultivo; y

(c) convertir dicho producto peptídico a un péptido amidado convirtiendo dicha glicina C-terminal a un grupo amino.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha conversión a péptido amidado se alcanza mediante:

(a) formación de una mezcla de reacción poniendo en contacto dicho producto peptídico con oxígeno y un agente reductor en presencia de peptidil glicina α -amidante monooxigenasa, o peptidil glicina α -hidroxilante monooxigenasa;

(b) si no se usa peptidil glicina α -amidante monooxigenasa en el paso (a), y si la mezcla de reacción no es ya básica, entonces aumentar el pH de la reacción hasta que sea básico; y

(c) recuperar dicho péptido amidado de dicha mezcla de reacción.

3. Un método para la expresión directa de un producto peptídico en un medio de cultivo que comprende los pasos de:

(a) cultivar células huésped de *E. coli* que comprenden un vector de expresión que comprende dos casetes de transcripción, en donde cada uno de dichos casetes de transcripción comprende

(i) una región codificante con ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico acoplado en el mismo marco de lectura en 3' de ácidos nucleicos que codifican un péptido señal; y

(ii) una región control operativamente unida con la región codificante, dicha región control comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión a ribosomas, en donde al menos uno de dichos promotores es tac,

en donde dichas células huésped expresan dicho producto peptídico junto con un péptido señal, en dicho medio, en condiciones en donde el crecimiento de dichas células huésped se controla para que esté dentro de un intervalo de 0,05 a 0,20 duplicaciones por hora; en donde está presente un inductor durante parte del periodo de dicho crecimiento controlado; y

(b) recuperar dicho producto peptídico del medio de cultivo.

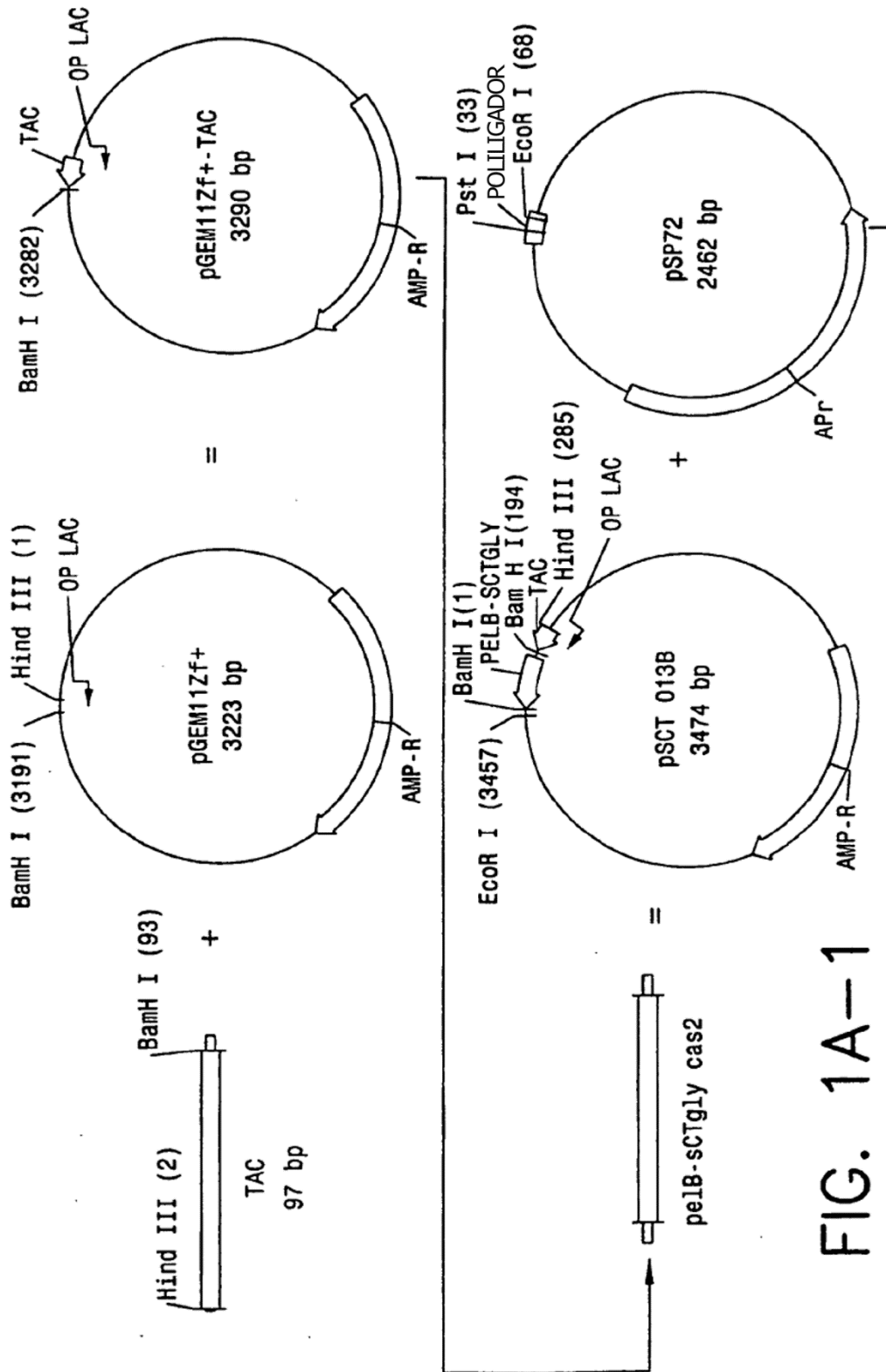


FIG. 1A-1

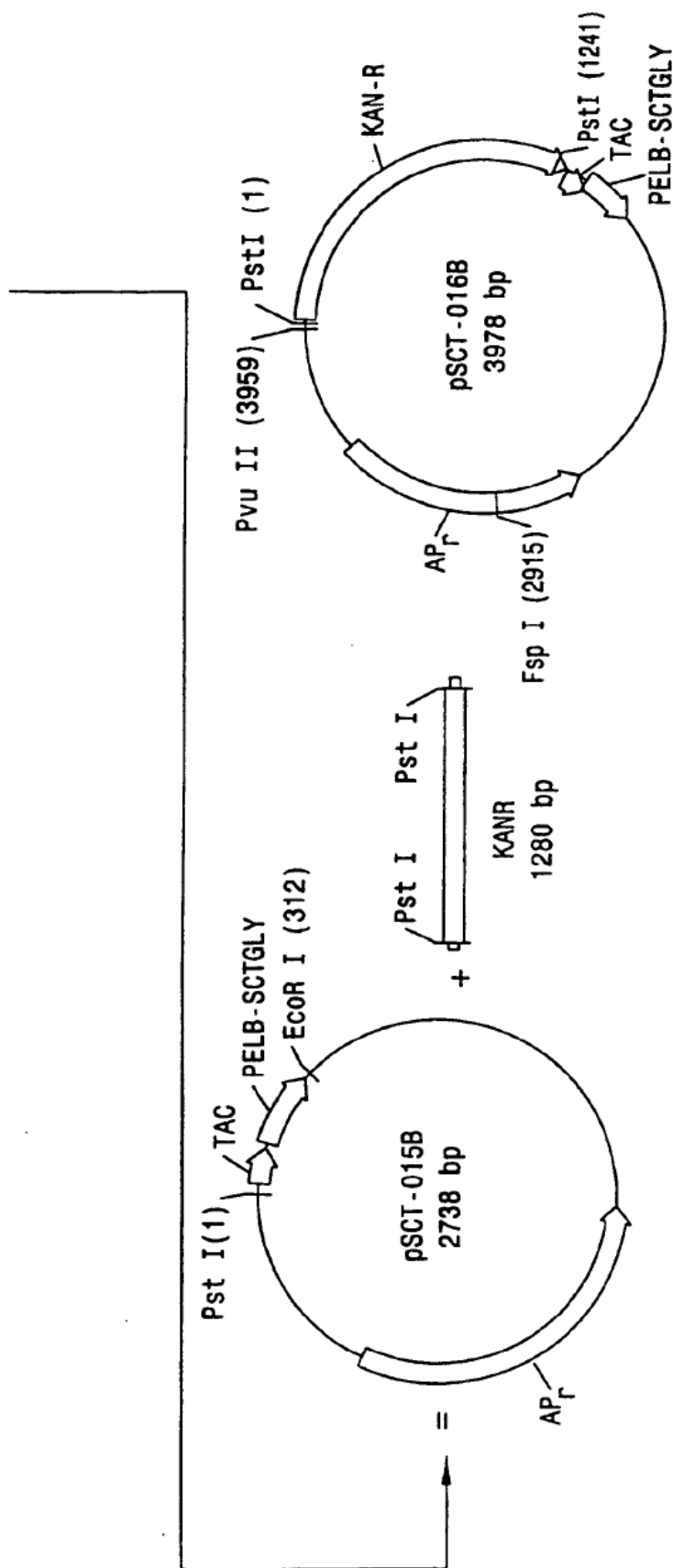


FIG. 1A-2

FIG. 1A-1

FIG. 1A-2

FIG. 1A

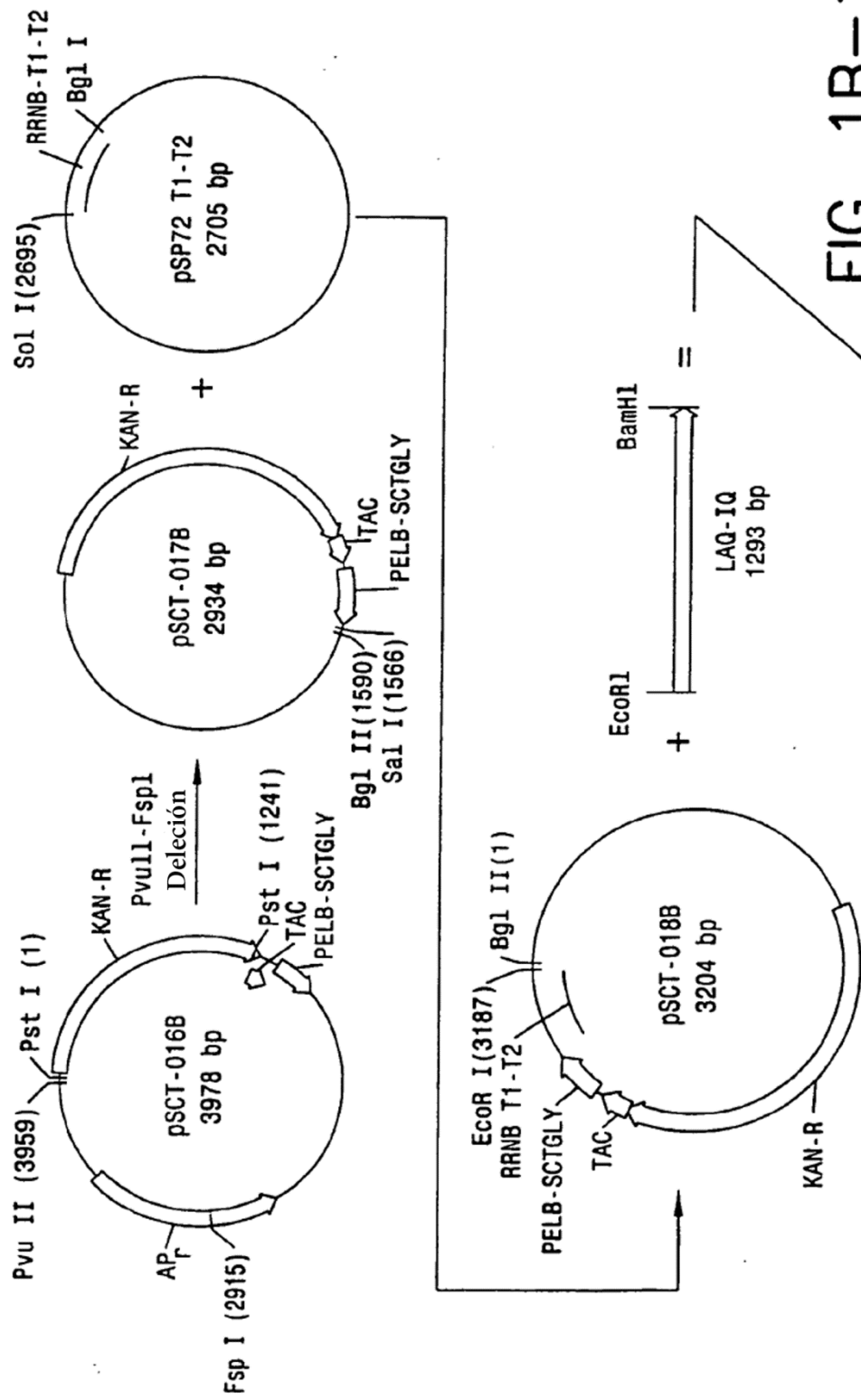


FIG. 1B-1

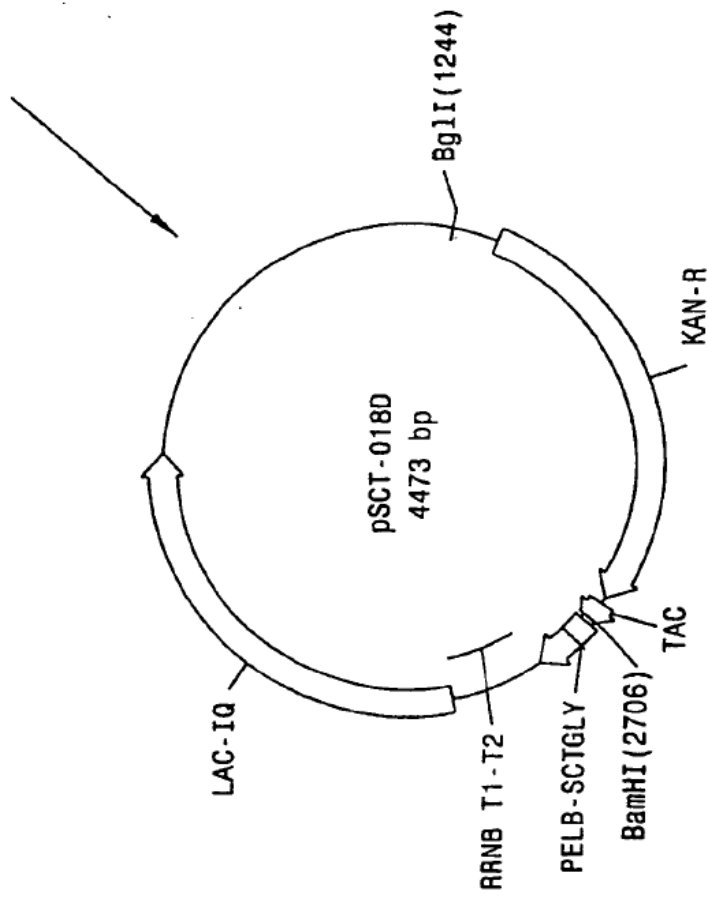


FIG. 1B-2

FIG. 1B-1
FIG. 1B-2

FIG. 1B

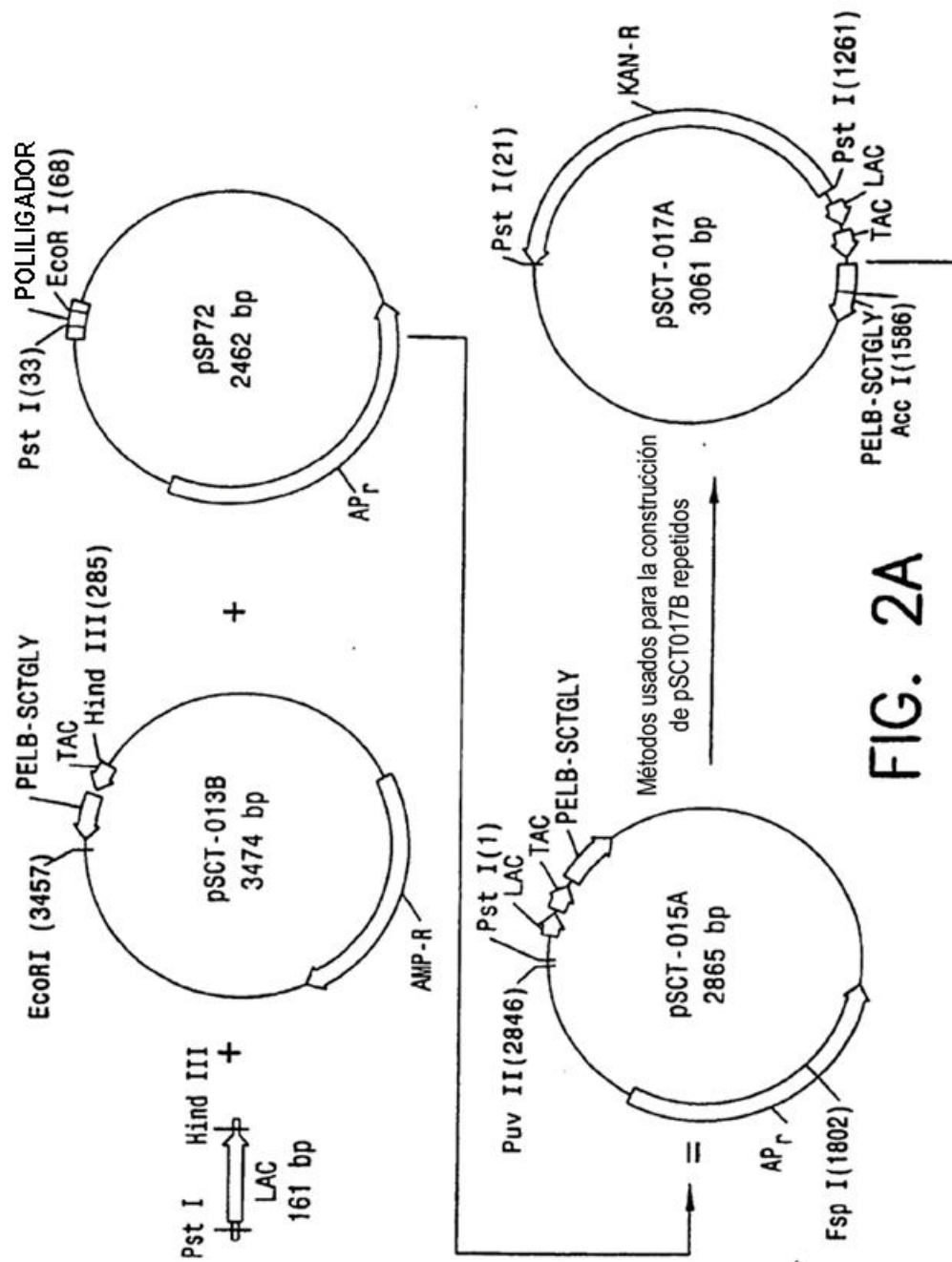


FIG. 2A

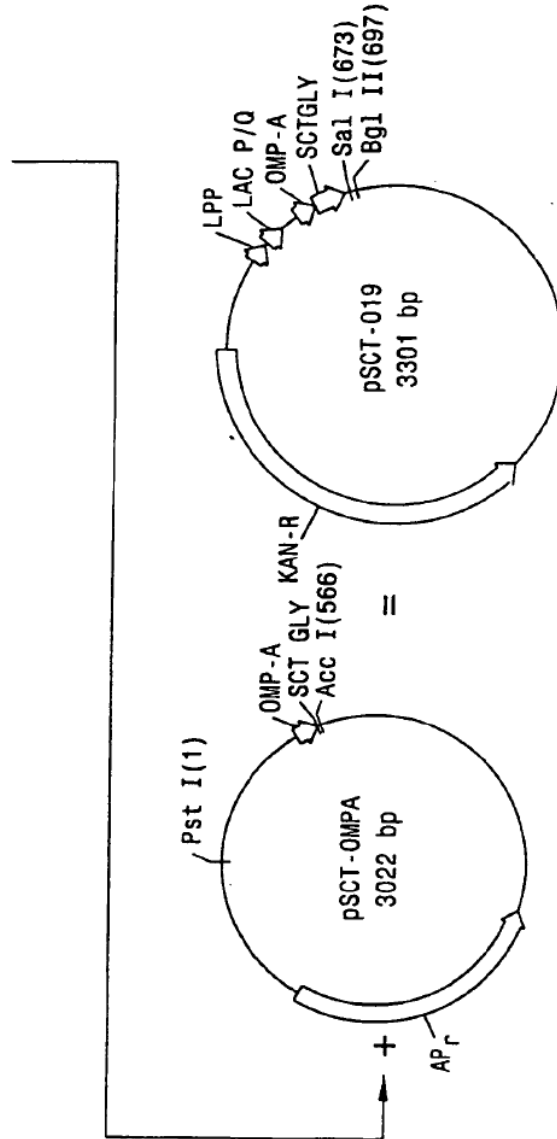


FIG. 2B

FIG. 2A
FIG. 2B

FIG. 2

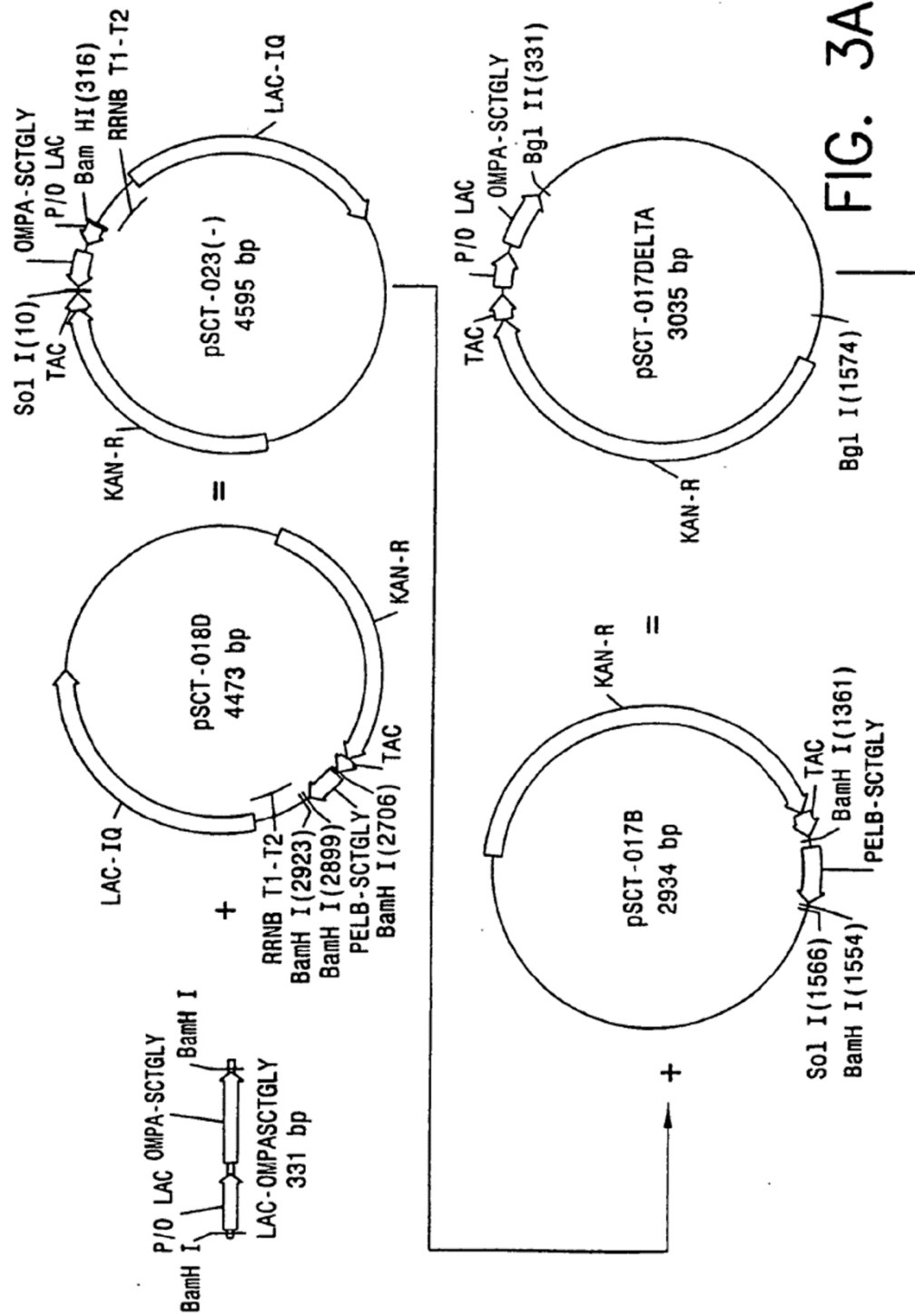


FIG. 3A

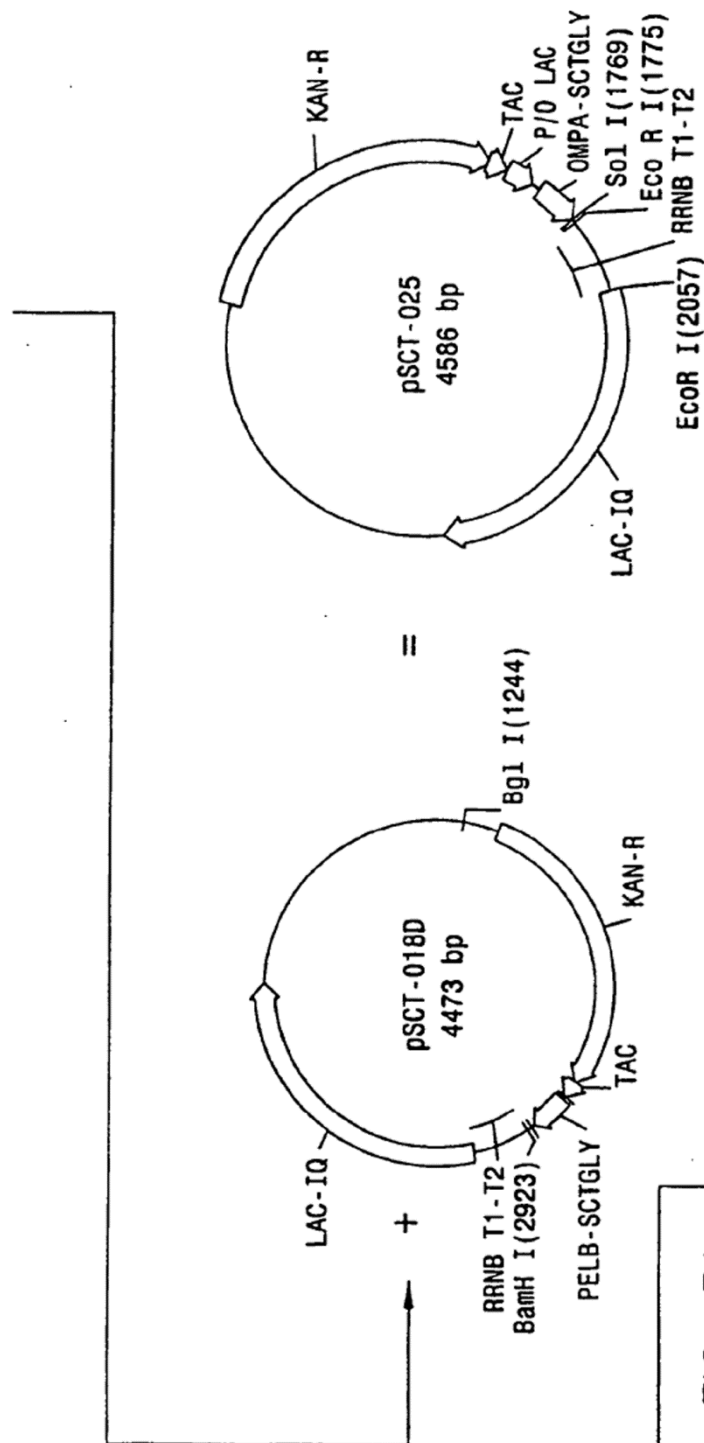


FIG. 3A
FIG. 3B

FIG. 3B

FIG. 3

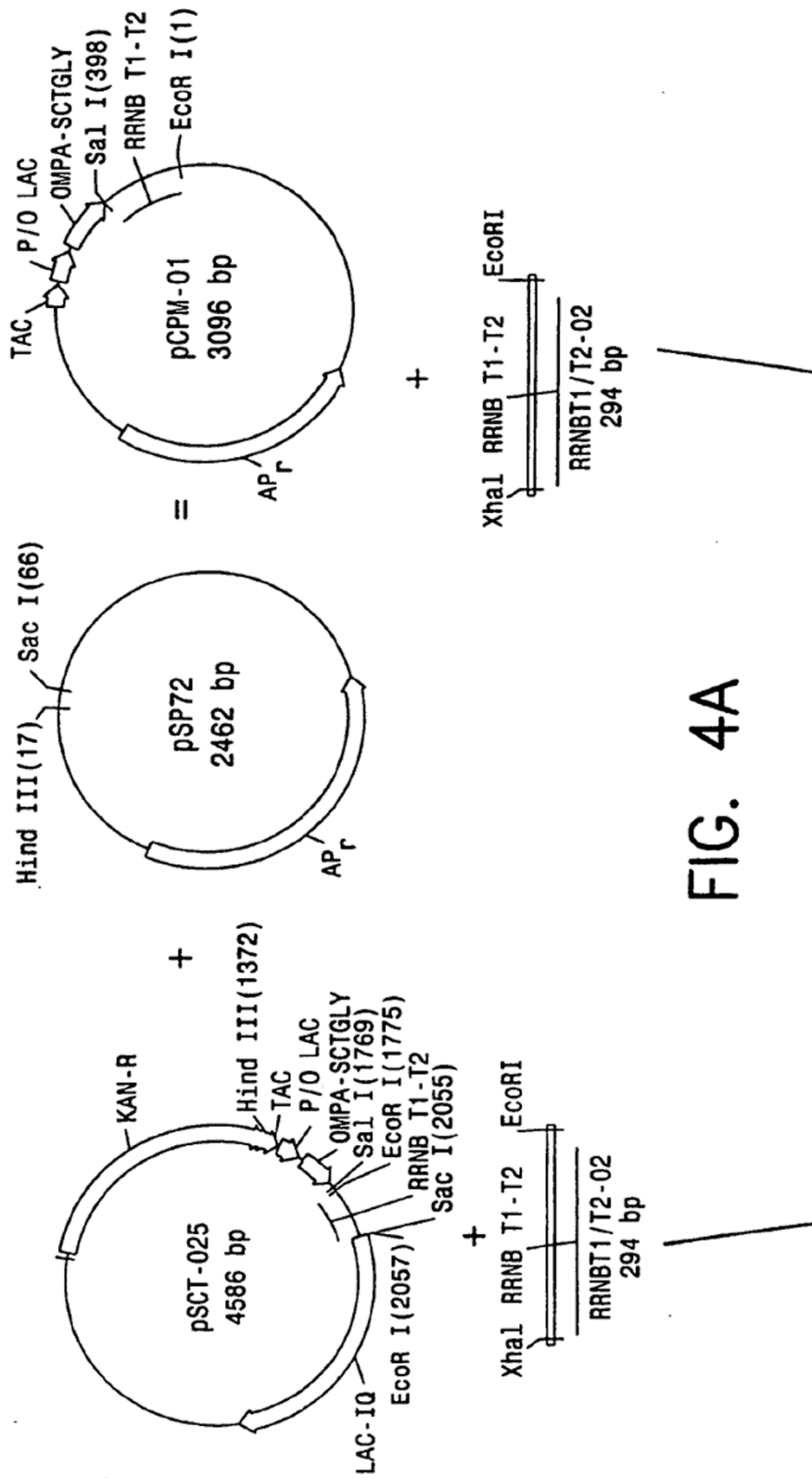


FIG. 4A

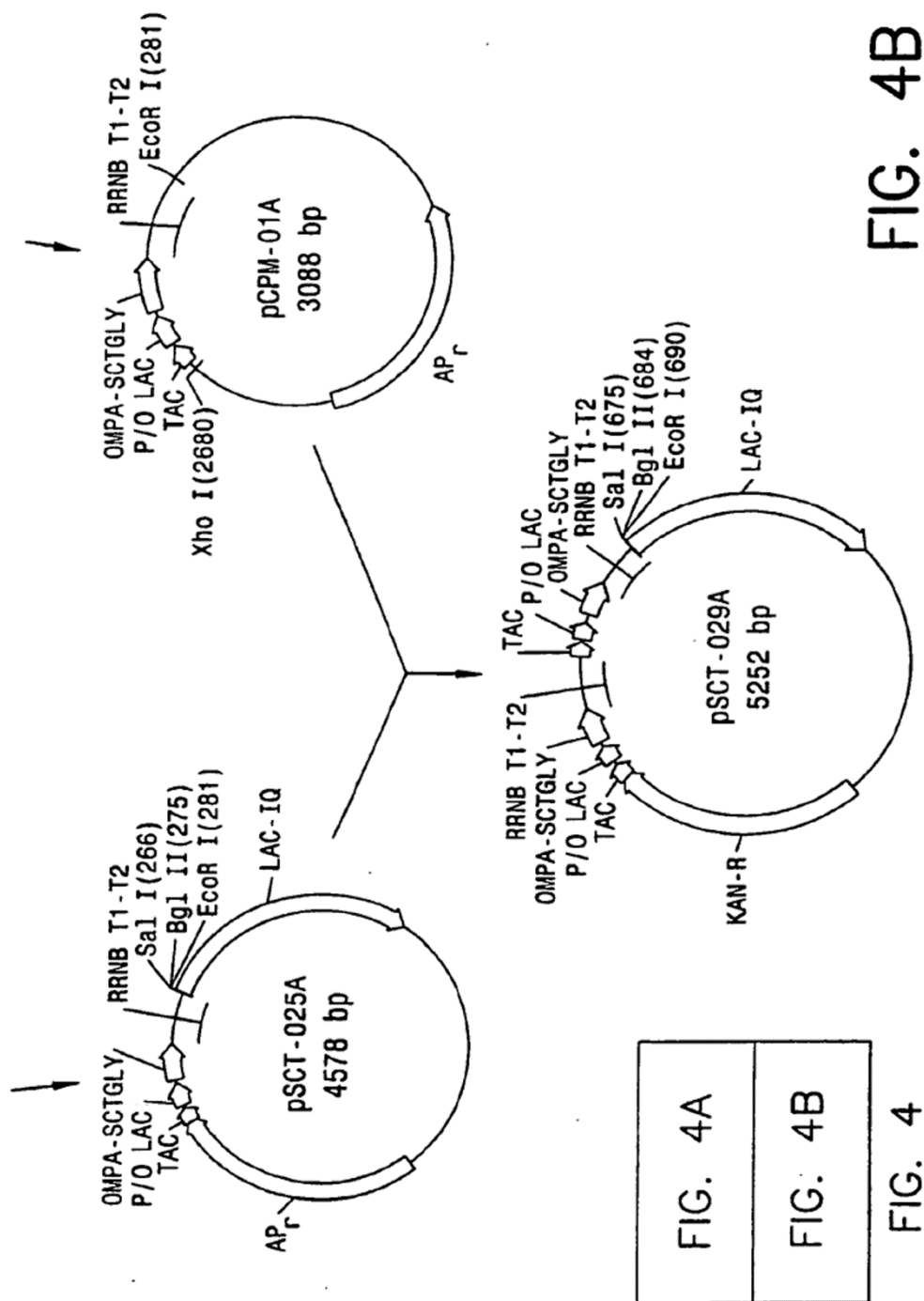


FIG. 4B

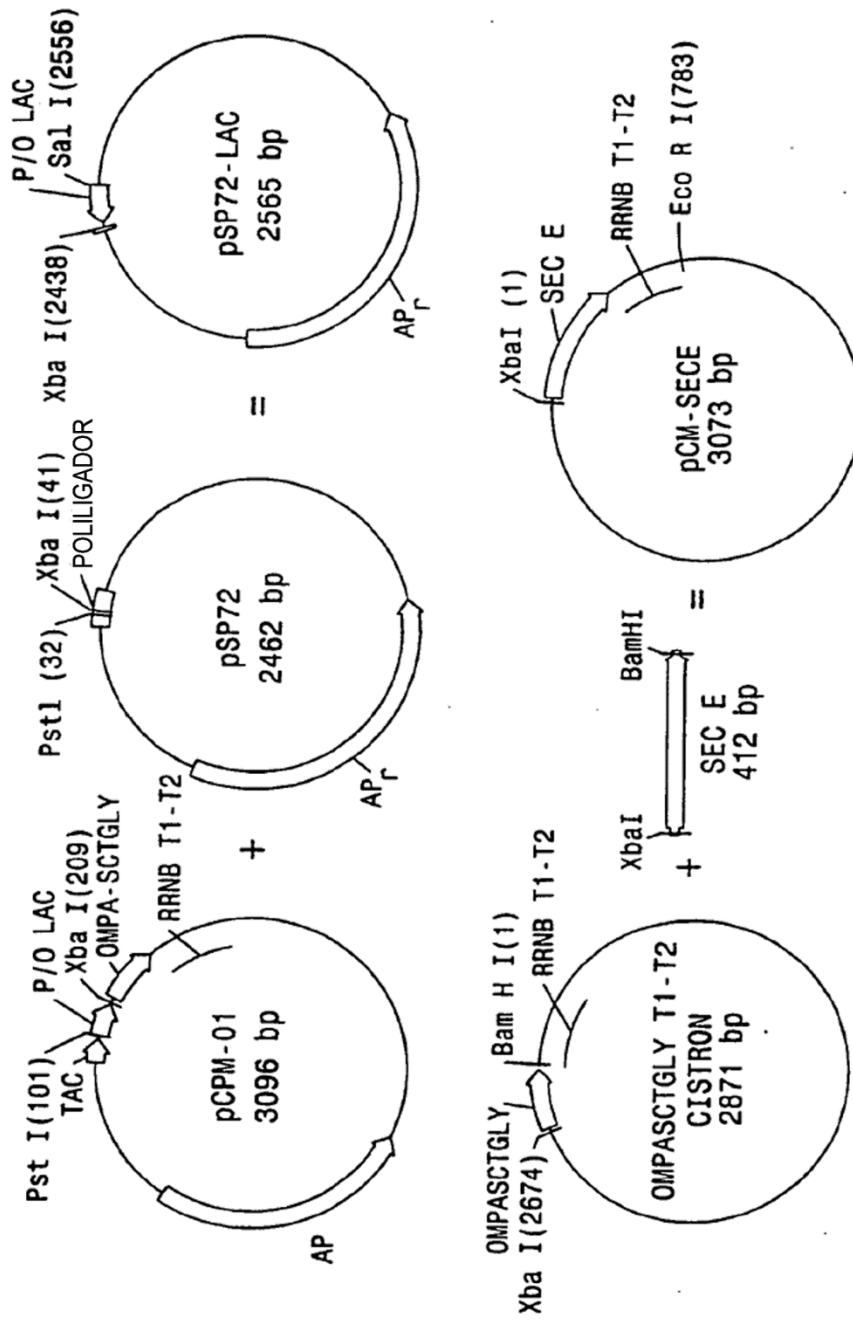


FIG. 5A

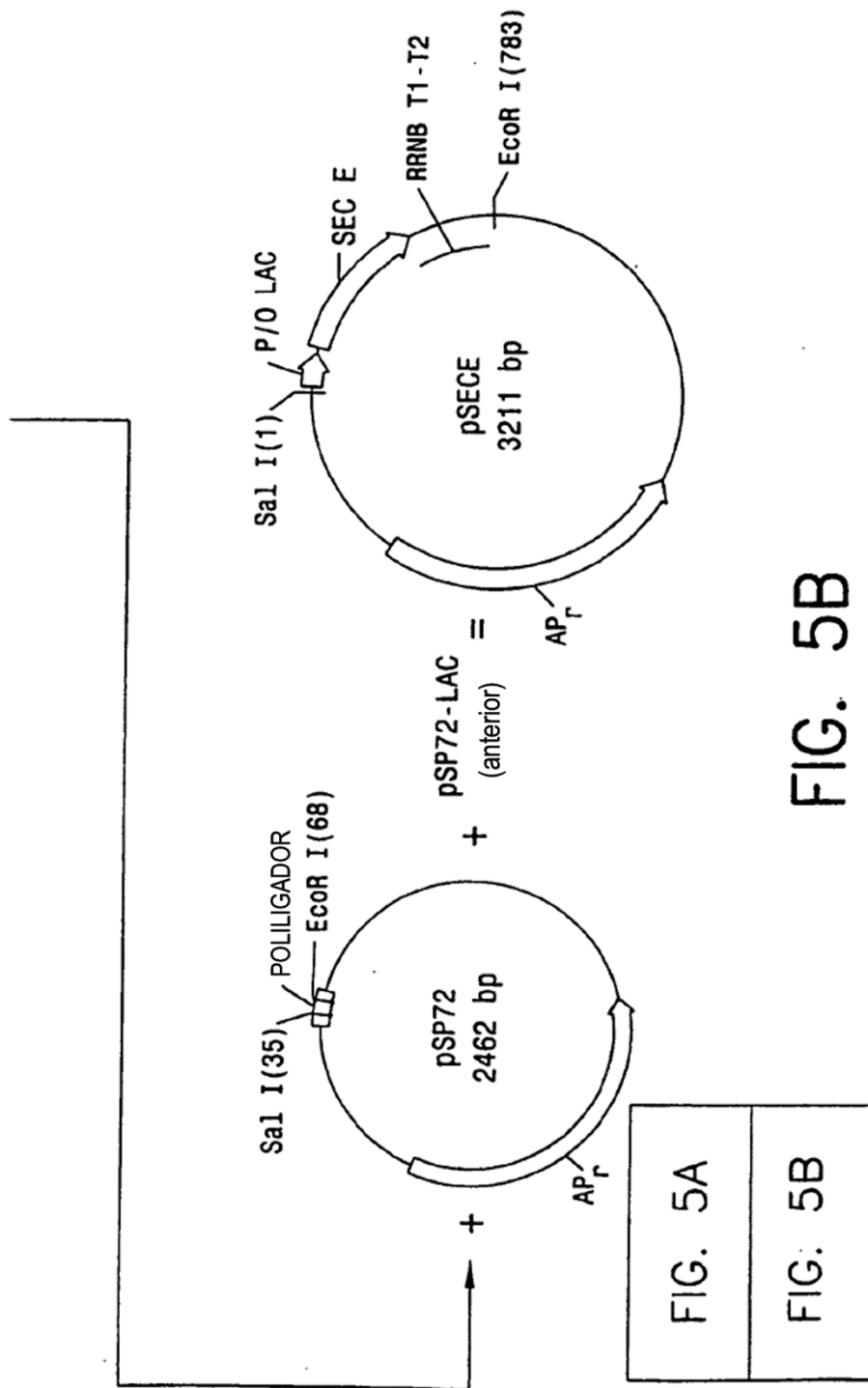


FIG. 5B

FIG. 5

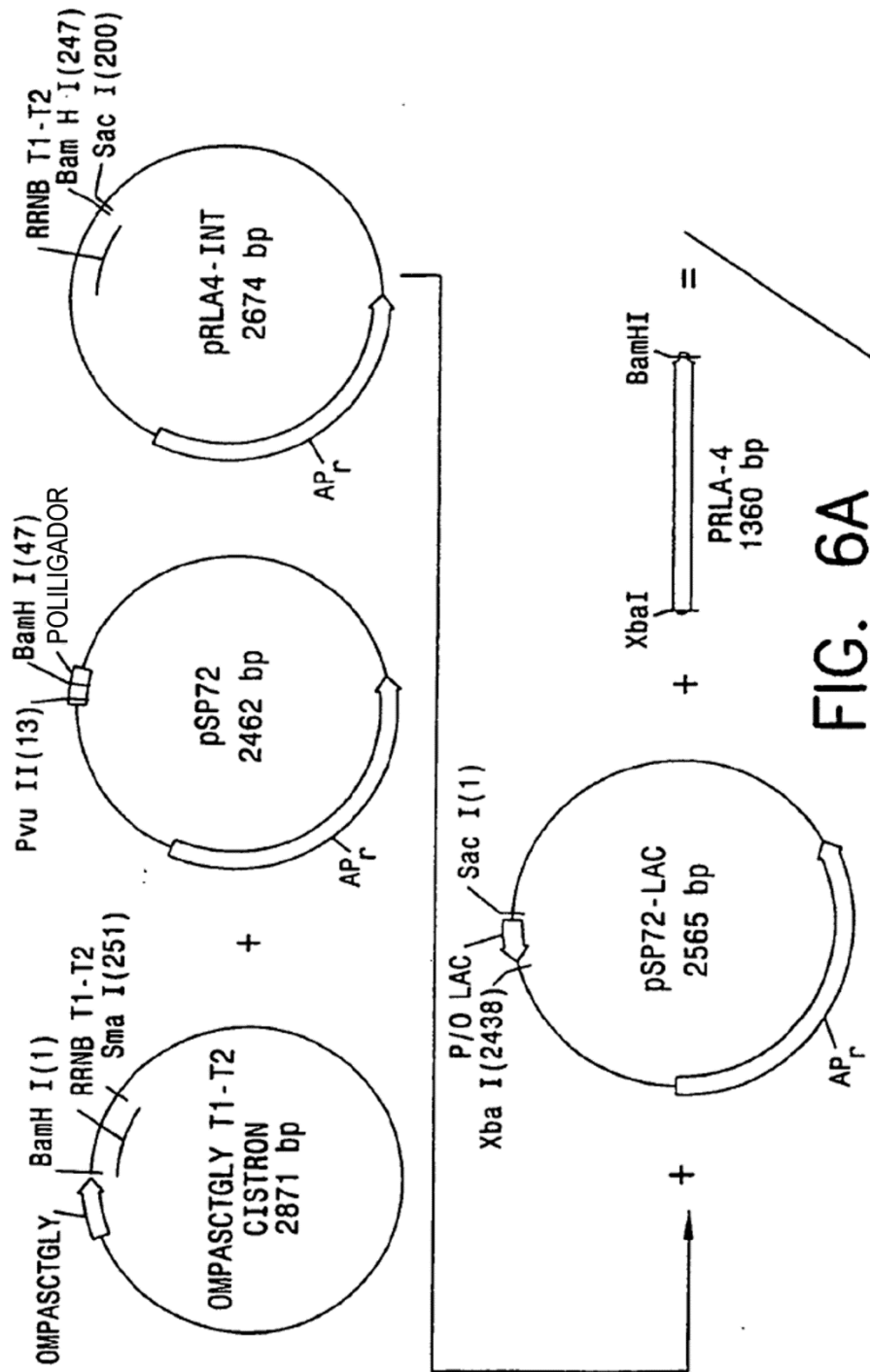


FIG. 6A

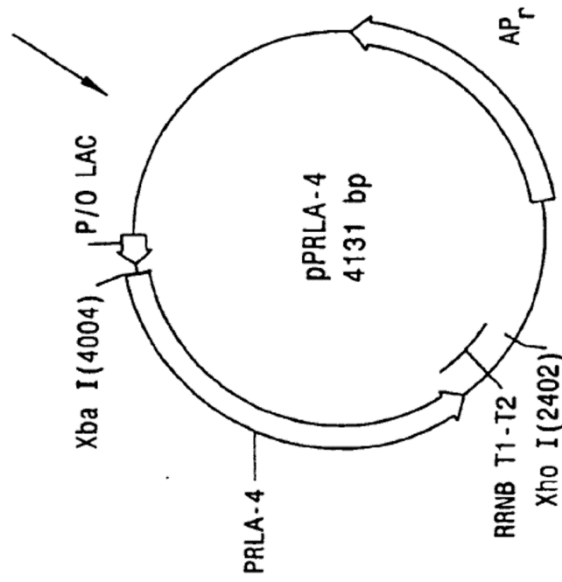


FIG. 6B

FIG. 6A
FIG. 6B

FIG. 6

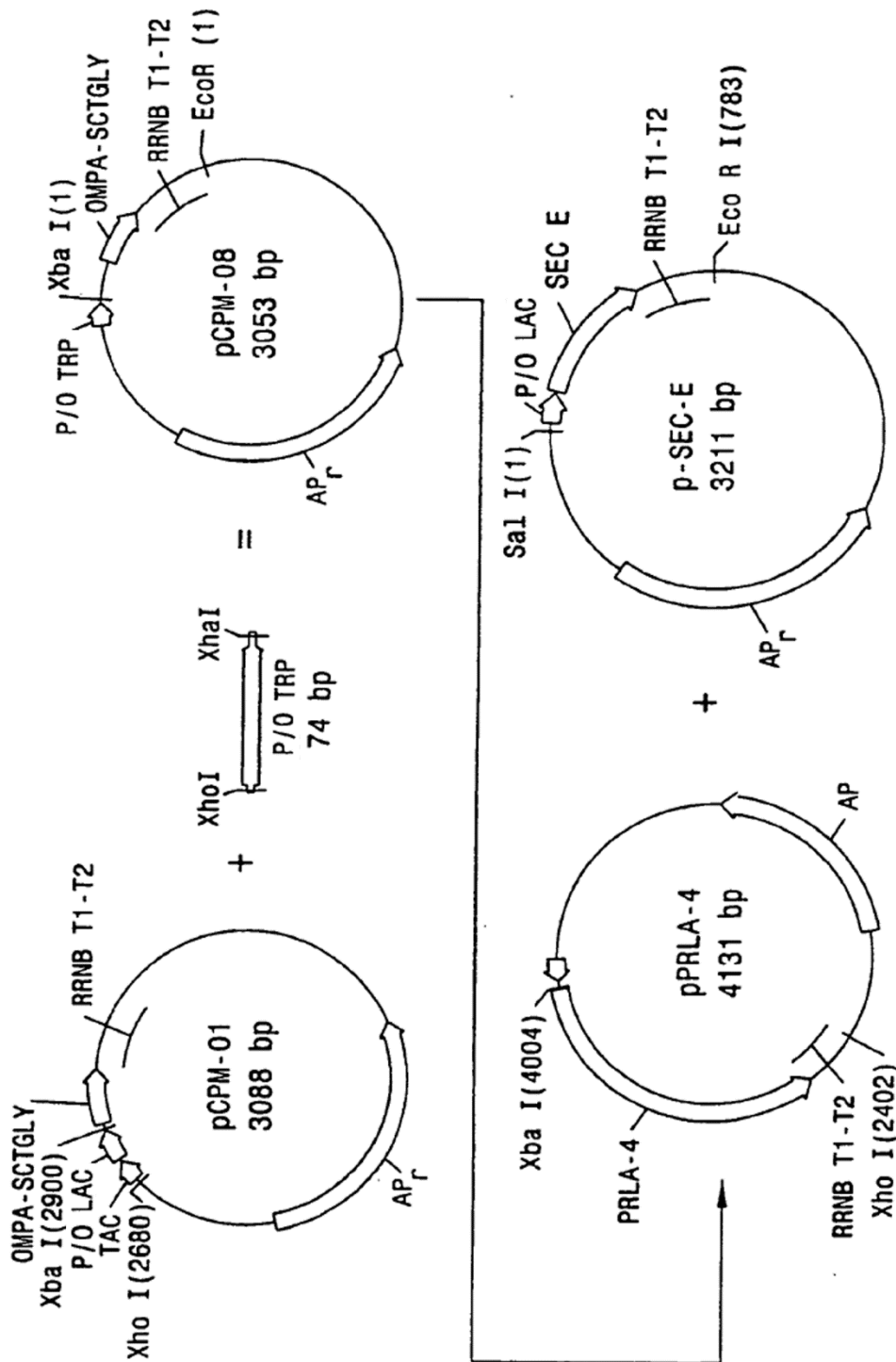


FIG. 7A

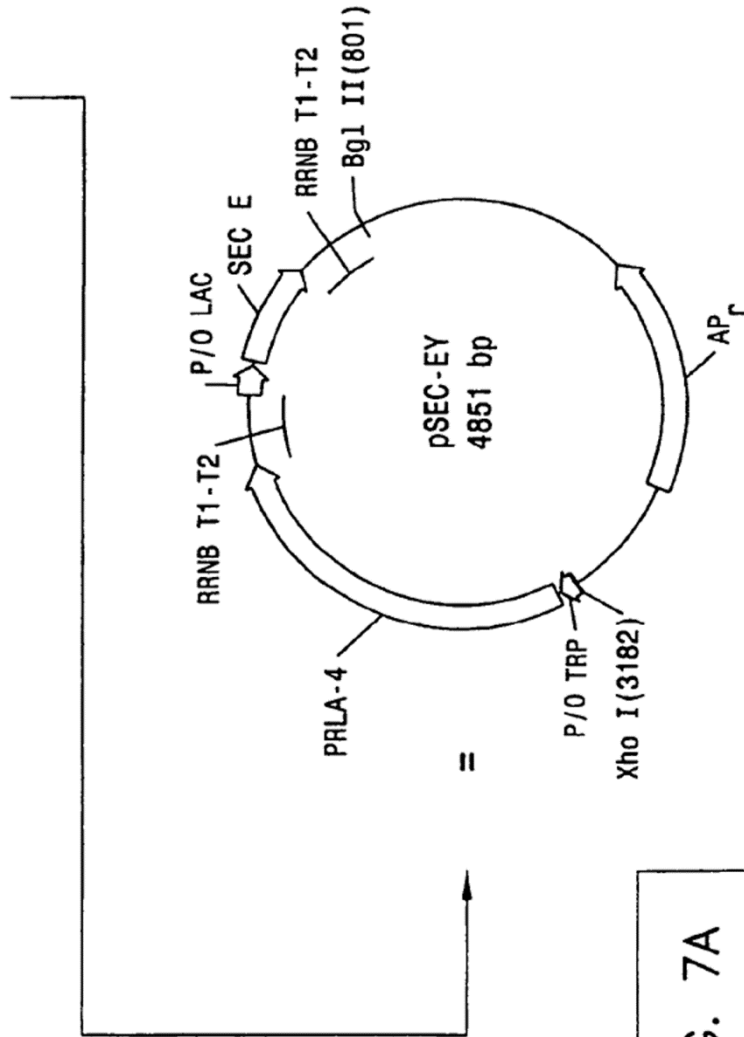


FIG. 7B

FIG. 7A

FIG. 7B

FIG. 7

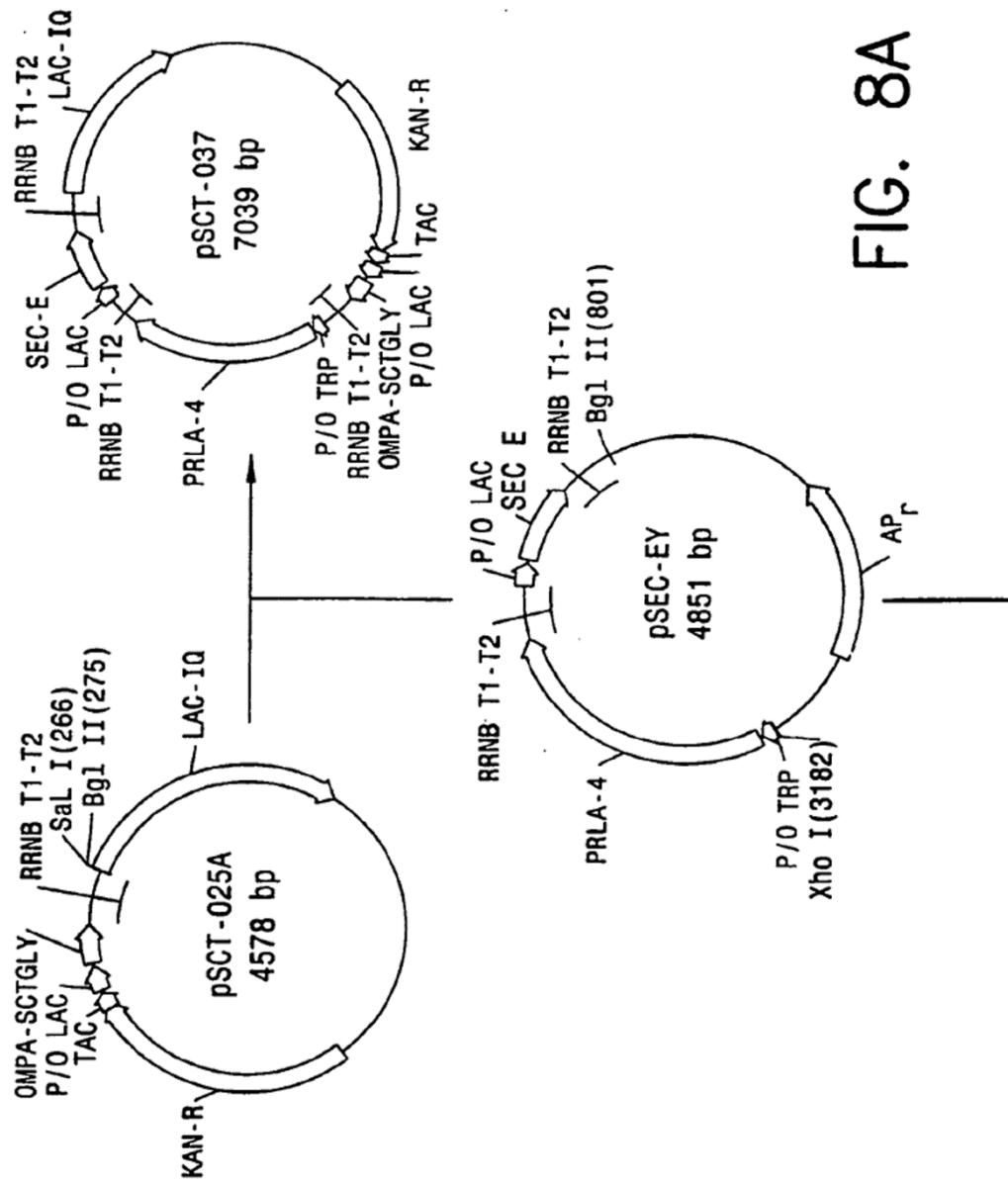


FIG. 8A

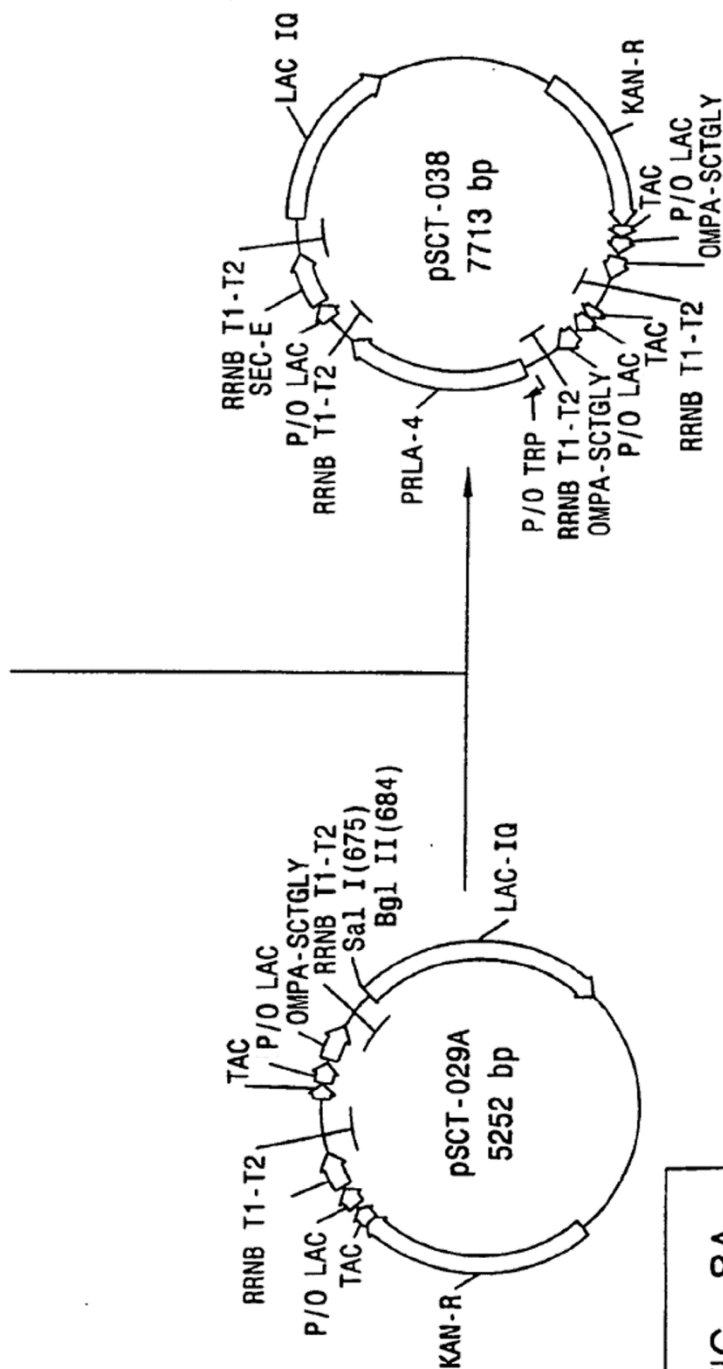


FIG. 8B

FIG. 8A
FIG. 8B

FIG. 8

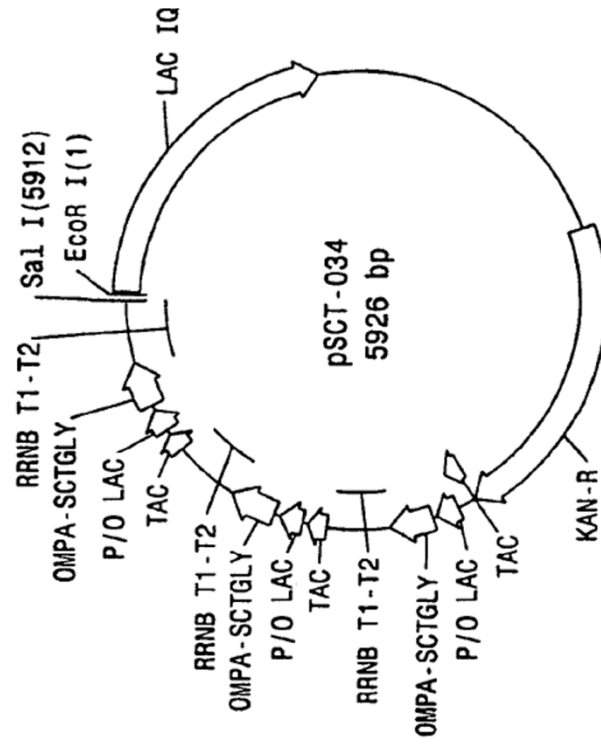


FIG. 9

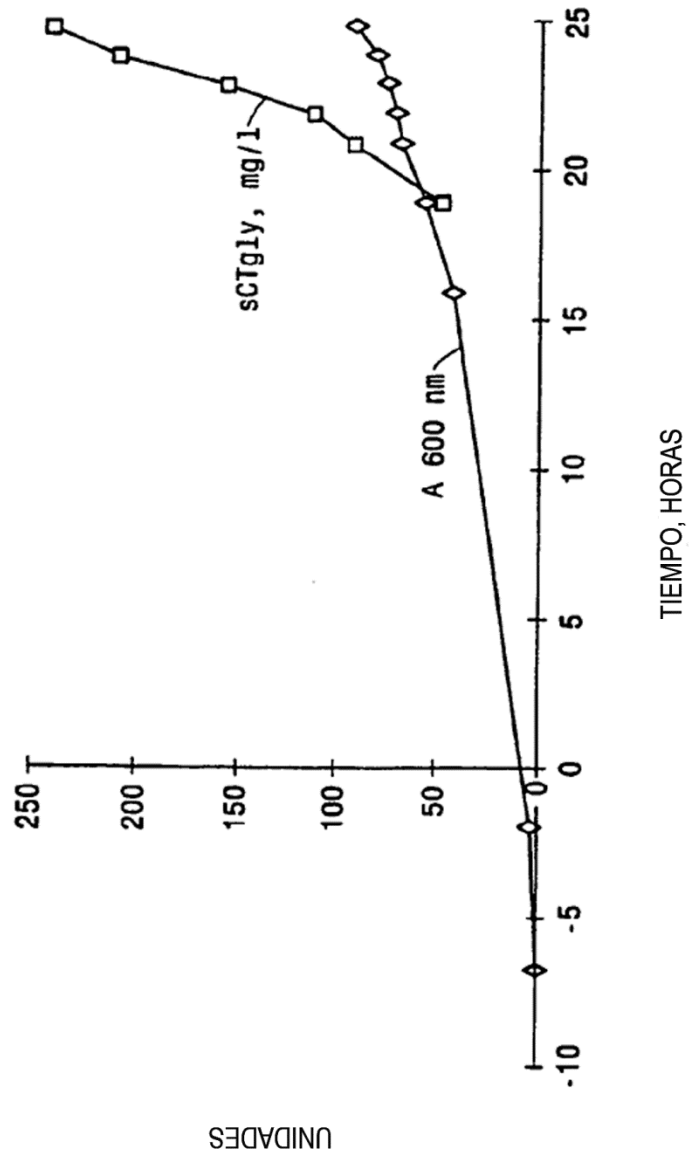


FIG. 10

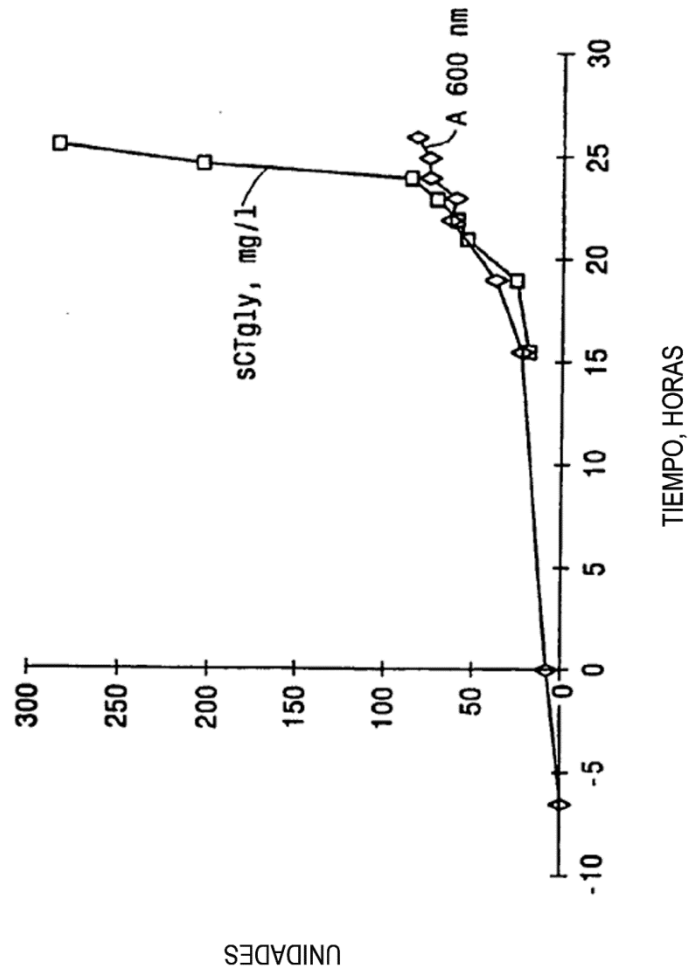


FIG. 11

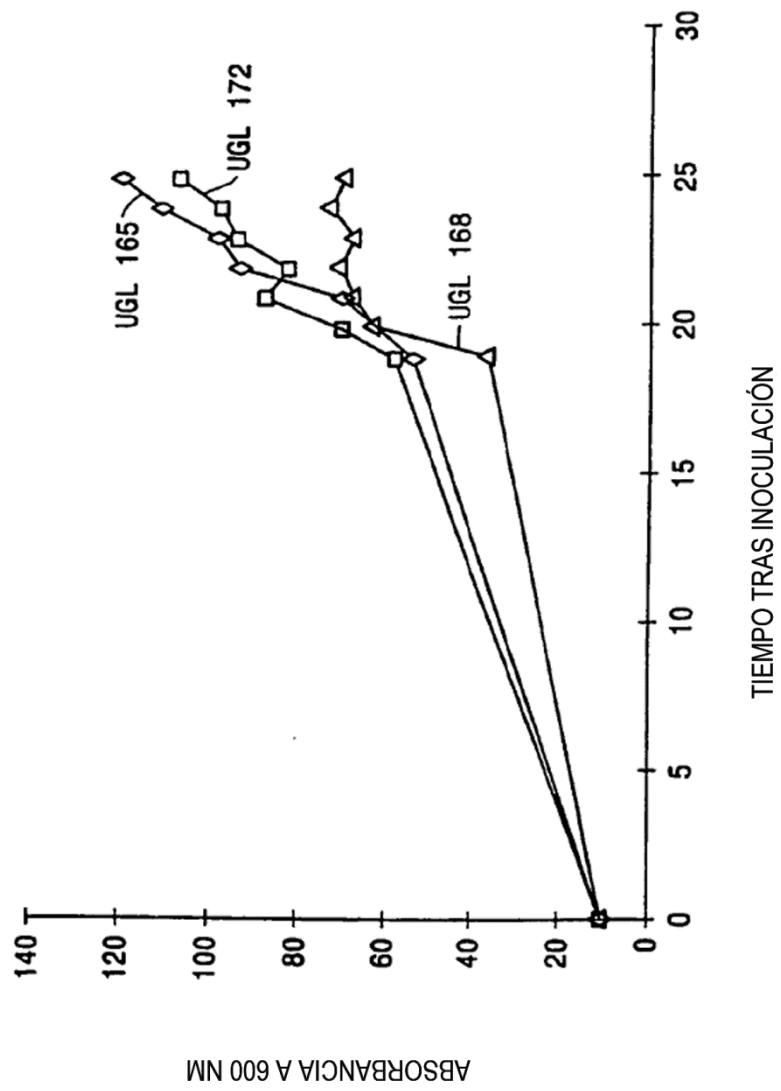


FIG. 12

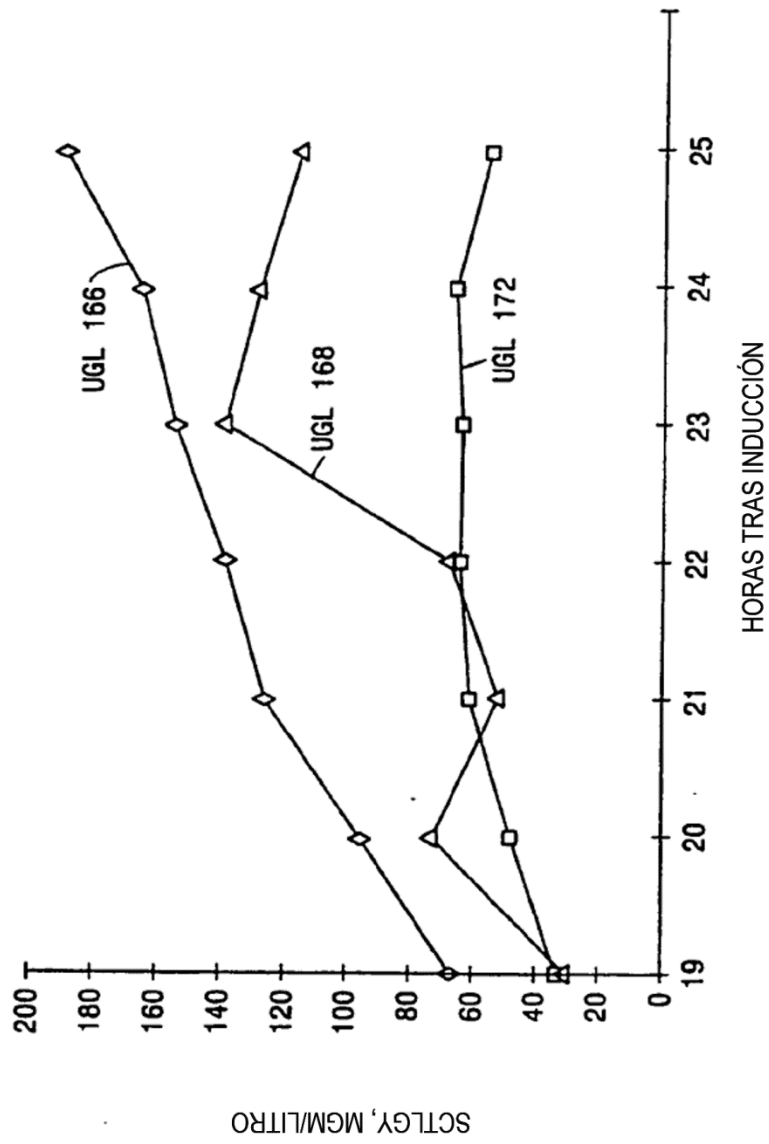


FIG. 13

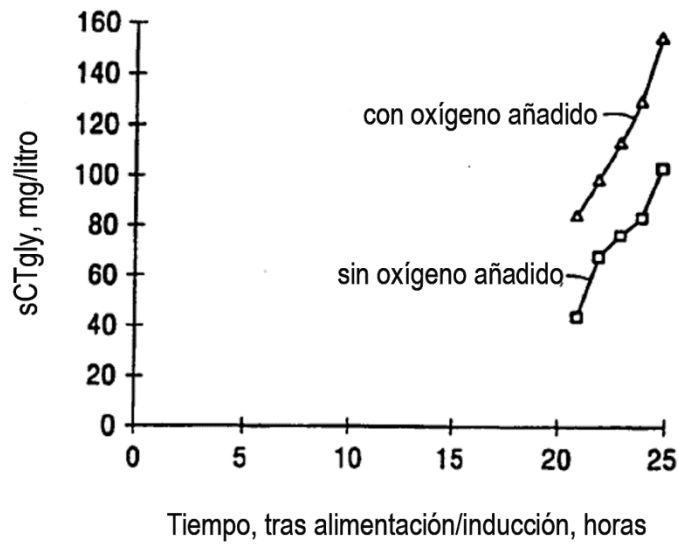


FIG. 14A

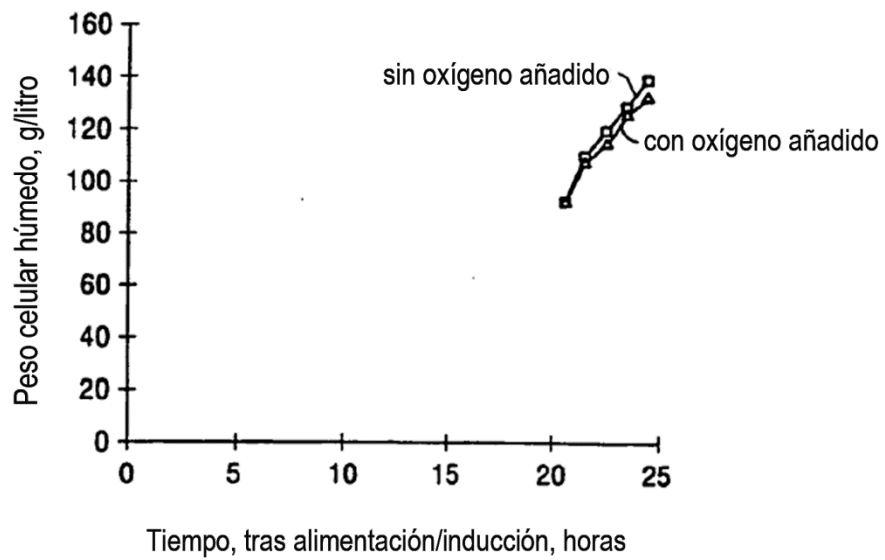


FIG. 14B

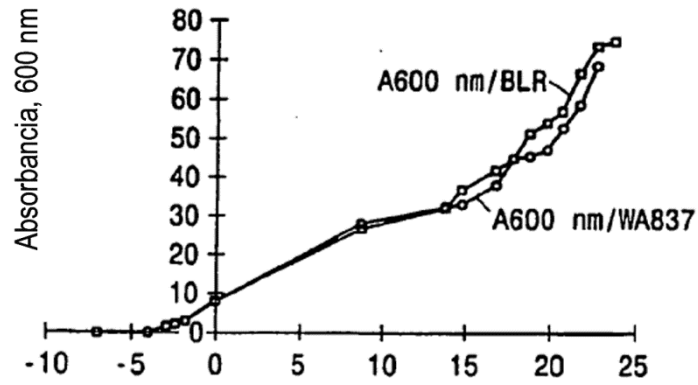


FIG. 15A

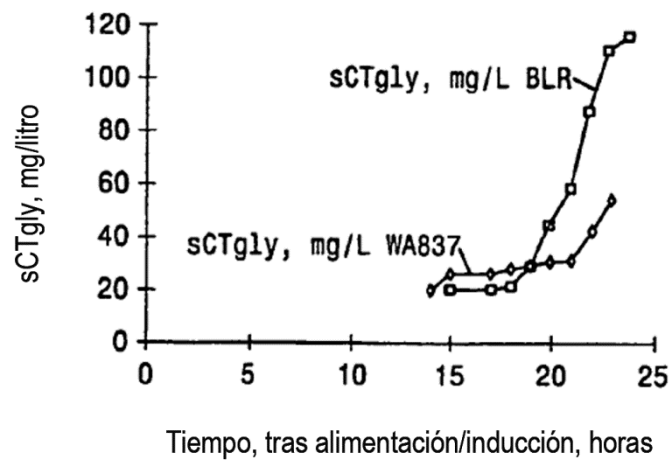


FIG. 15B

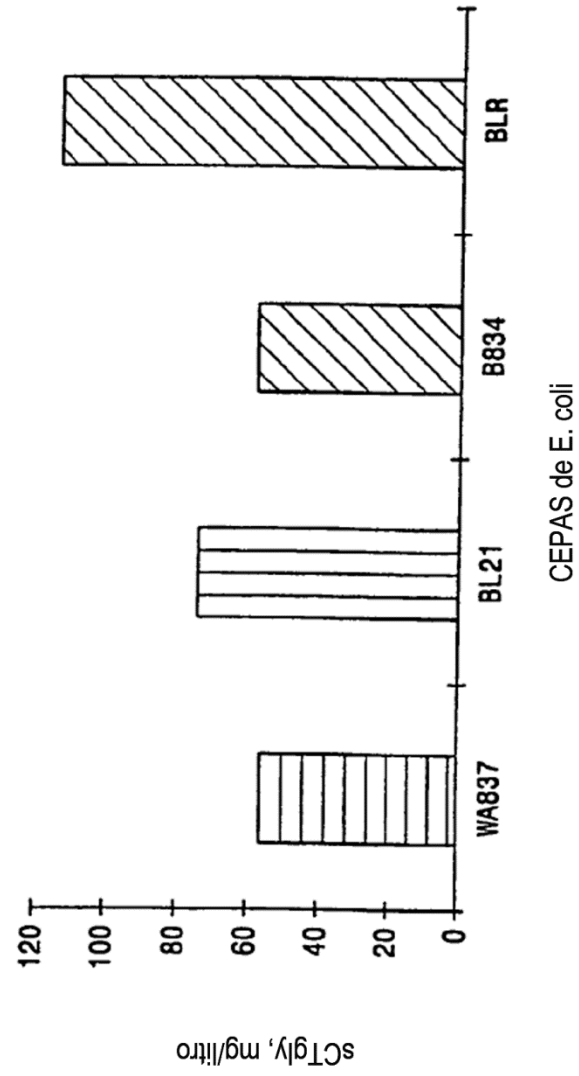


FIG. 16

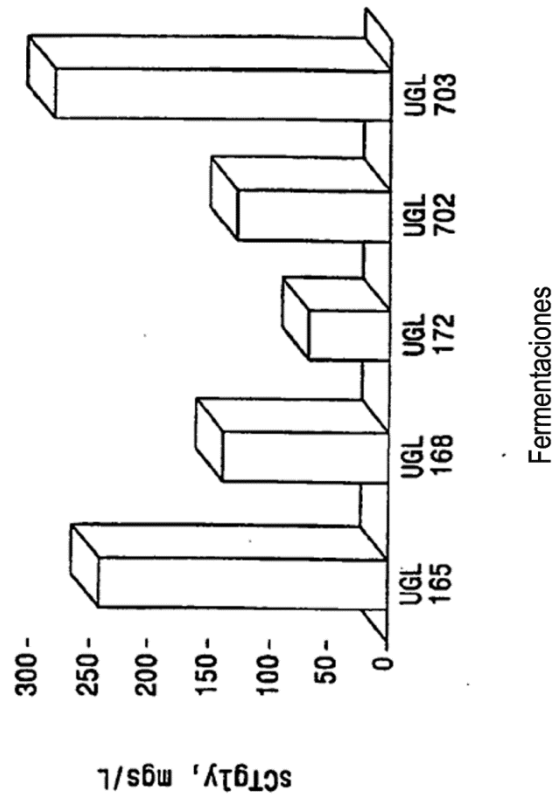


FIG. 17