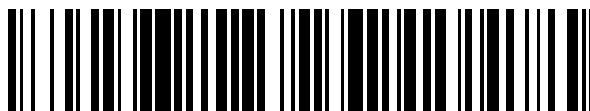


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 573**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54

(2006.01)

C12P 21/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06778399 .3**

96 Fecha de presentación: **30.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1924601**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2008**

54 Título: **EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN E. COLI.**

30 Prioridad:
30.08.2005 EP 05107918

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:
WÖLDIKE, Helle y
SCHIØDT, Christine, Bruun

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

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 2 375 573 T3

DESCRIPCIÓN

Expresión de proteínas en E.coli

5 Antecedentes de la invención

[0001] Sistemas de expresión de proteína recombinante facilitan la producción de proteína, polipéptidos y péptidos para selección en el descubrimiento de medicamento y para una gama amplia de de aplicaciones incluyendo la producción de vacunas. Sistemas de expresión bacterianos han sido el método principal de elección, en gran medida debido a la
10 facilidad de clonación de genes en bacterias, aunque levadura y baculovirus proporcionan sistemas de expresión alternativos fiables.

[0002] A pesar del uso amplio de sistemas de expresión recombinantes para la producción de proteínas, no se puede confiar en que los métodos disponibles produzcan cualquier proteína dada en rendimientos suficientes y teniendo
15 homogeneidad suficiente para cumplir los requisitos siguientes. Rendimiento de proteína puede ser un problema mayor asociado a la sobreexpresión de proteínas en bacterias, donde la proteína es directamente tóxica para la célula huésped, o donde su acumulación trastoca el metabolismo o crecimiento de célula huésped. Proteínas grandes, al igual que proteínas con una estructura secundaria y terciaria compleja, tienden a ser insolubles y acumularse en cuerpos de inclusión en la célula huésped, donde generalmente son mejor toleradas por el huésped. No obstante, proteínas más
20 pequeñas tienden a ser solubles y su acumulación puede ser tóxica. Varios sistemas de vectores se diseñan para expresar la proteína recombinante objetivo como una proteína de fusión con una marca peptídica N-terminal corta o más largo. Tales marcas, como las marcas de unión a histidina o maltosa, son particularmente útiles para la purificación subsiguiente de las proteínas recombinantes. Permanece, sin embargo, una necesidad de un sistema de expresión eficiente, especialmente paraproteínas terapéuticas que son potencialmente tóxicas y difíciles de expresar.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

[0003] La invención proporciona un plásmido de ADN autorreplicante para expresión recombinante de una proteína marcada N-terminalmente en una célula huésped microbiana comprendiendo una marca de ADN con una secuencia de
30 nucleótidos que codifica una marca peptídica de la fórmula MKMK, MKTK o MKSK, donde dicho ADN es operativamente enlazado a una secuencia del promotor.

[0004] La invención además proporciona un plásmido de ADN autorreplicante para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana comprendiendo una marca de ADN, donde dicha marca de ADN codifica al menos cuatro residuos de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de
35 SEC ID n°: 15.

[0005] En una forma de realización, el plásmido de la invención comprendiendo además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína fundida en marco interno con dicha marca de ADN para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal codificada por dicho ácido nucleico fundido a dicha marca de ADN.
40

[0006] En otra forma de realización, el plásmido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 5.

[0007] En otra forma de realización, el plásmido de la invención tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID n°: 4.
45

[0008] La invención además proporciona una célula huésped microbiana comprendiendo el plásmido según la invención.

[0009] En una forma de realización, la célula huésped microbiana según la invención, es E. coli.
50

[0010] La invención además proporciona una proteína marcada comprendiendo una marca de péptido N-terminal fundida a una proteína, donde dicha marca tiene al menos cuatro residuos de aminoácidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionado de entre SEC ID NOs: 14, 15 y 16.

[0011] En una forma de realización, la proteína marcada de la invención tiene al menos cuatro residuos de aminoácidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOs: 15.
55

[0012] En una forma de realización, la proteína marcada de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 5.
60

[0013] La invención además proporciona un método para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana que incluye las etapas de construcción de un plásmido recombinante comprendiendo inserción de una secuencia de ADN que codifica una proteína dentro del marco interno y 3' a la marca de ADN del plásmido según la presente invención, e introducción de dicho plásmido recombinante en una célula huésped microbiana, e inducción de expresión de dicha proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana.
65

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

Figura 1: Gel de SDS-poliacrilamida, manchado con azul de Coomassie que muestra fracciones de columna SP de sefarosa probadas durante purificación de MKHK-hIL-21 expresado de forma recombinante: sendero 1; marcadores de peso molecular de proteína; senderos 2-10 son fracciones a partir de la columna SP de sefarosa. Figura 2: la eficiencia y finalización de eliminación de marca para producir hIL-21 maduro fue determinada por espectrometría de masas, como se muestra en Figura 2, A y B.

Panel A muestra el espectro Maldi de fracciones antes de la eliminación de marca

Panel B muestra las mismas fracciones después de la eliminación de marca.

ABREVIATURAS:

[0015]

Aminoácido: alanina (A); arginina (R); asparagina (N); ácido aspártico (D); cisteína (C); glicina (G); glutamina (q); ácido glutámico (E); histidina (H); isoleucina (I); leucina (L); lisina (K); metionina (m); fenilalanina (F); prolina (P); serina (S); treonina (T); triptófano (W), tirosina (Y); valina (V). C-terminal: carboxi (parte C)-terminal de una proteína, comprendiendo uno o más residuos de aminoácidos. hIL-21: humano interleuquina-21 N-terminal: amino (N)-terminal parte de una proteína, comprendiendo uno o más residuos de aminoácidos. SDS página: dodecilo de sodio (lauril) gel de sulfato-poliacrilamida

Descripción de la invención

[0016] La presente invención proporciona una marca de ADN, un vector de expresión o plásmido adecuado para la expresión recombinante de una proteína heteróloga, y un método para expresión de proteína recombinante, que es compatible con la purificación posterior de la proteína recombinante, y tratamiento eventual de la proteína recombinante para recuperación de la proteína en su forma nativa y activa.

[0017] Como se utiliza en este caso, el término "DNA tag" (marca de ADN) se define como una molécula de ADN que codifica una marca de proteína N-terminal que se añade a una codificación de secuencia de ADN para una proteína heteróloga, y que en la expresión en marco en un microorganismo produce una proteína contraseñada o proteína de fusión. La marca de ADN puede codificar al menos cuatro aminoácidos con una secuencia de aminoácidos definido por fórmula I.

[0018] En una forma de realización, n es 1.

[0019] En una forma de realización, X1 representa H o K.

[0020] En una forma de realización, X2 representa A, H, M, S o T.

[0021] Una marca de ADN puede codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de la lista dada en la tabla 1, con una SEC ID Nos: 6-16. Como ilustrado en ejemplo 1, la expresión de una secuencia de ADN comprendiendo una marca de ADN, fundida dentro del marco interno a la secuencia codificante de una proteína, facilita niveles significativamente más altos de expresión de la proteína que una secuencia de control que codifica la proteína fundida a una metionina N-terminal. La marca de ADN puede codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre MHAH, MHHA, MHV, MKHK, MKMK, MKSK, y MKTK, con respectivamente SEC ID Nos: 7, 8, 10, 11, 14, 15 y 16. La marca de ADN puede codificar la secuencia de aminoácidos MKSK [SEC ID n°: 15]. No deseando quedar atados por la teoría, se cree que la expresión de proteína recombinante en una célula huésped microbiana, en particular una célula E.coli, es mejorada si la proteína expresada se acumula en una forma que no sea tóxica a metabolismo de célula huésped o crecimiento, por ejemplo en un cuerpo de inclusión. Así las marcas de proteína N-terminal seleccionadas fundidas a proteínas recombinantes pueden mejorar su expresión por facilitar su acumulación en cuerpos de inclusión.

[0022] Muchas proteínas mamíferas de interés se segregan en su huésped natural y son sintetizadas con un péptido señal, que se corta durante la secreción. El extremo N-terminal de la proteína segregada madura por lo tanto en la mayoría de los casos inicia con un aminoácido diferente de metionina, el extremo N-terminal natural de todas las proteínas novo sintetizadas, incluyendo proteínas heterólogas, intracelularmente acumuladas en la E.coli. Para evitar incertidumbres sobre escisión de la metionina N-terminal, la adición de una pequeña marca peptídica como se describe, con propiedades de escisión conocidas in vitro, es altamente ventajosa para obtener la proteína madura de interés.

[0023] La marca de ADN se puede adicionar a una secuencia de ADN que codifica una proteína para los fines de su expresión recombinante en una célula huésped microbiana, en particular una célula bacteriana. La marca de ADN tiene aplicación en la expresión recombinante de un número amplio de proteínas útiles en una célula huésped microbiana, en particular para la expresión de proteínas terapéuticas, por ejemplo hormona de crecimiento humano, IL-20; IL-21, y GLP-1. La marca de ADN que codifica la marca de péptido N-terminal se funde dentro del marco de lectura con la secuencia de ADN que codifica la proteína a ser expresada, de manera que el producto de expresión obtenible en una

célula huésped es una proteína marcada o de fusión. Si la marca de ADN codifica una marca peptídica N-terminal que es más que cuatro aminoácidos, la marca peptídica es preferiblemente extendida por la adición de dipéptidos, cuya composición de aminoácido es compatible con su escisión por una diaminopeptidasa, tal como amino-peptidasa dipeptidil I. Dipéptidos que son compatibles con escisión por una diaminopeptidasa incluyen cualquier par de los aminoácidos encontrados en posiciones 1+2 o 3+4 de las secuencias de marca peptídicas catalogadas en la tabla 1. Por ejemplo, dipéptidos adecuados encontrados en la marca codificada por constructo DAP14 son MH y AH. La proteína expresada marcada o de fusión puede comprender la marca peptídica fundida directamente al primer aminoácido de la proteína madura a ser expresada, de manera que la escisión de la marca peptídica con la eliminación de dipéptidos libera la proteína expresada en su forma madura. En el caso de que la marca peptídica de la proteína expresada marcada o de fusión deba ser quitada por una aminopeptidasa, es deseable asegurar que la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína expresada comience con o sea precedida por un residuo que pueda funcionar como un punto de parada más allá del que la aminopeptidasa no pueda continuar. De esta manera la forma madura de la proteína expresada se protege de escisión proteolítica N-terminal.

Un residuo de aminoácido adecuado que puede actuar como un punto de parada para una diaminopeptidasa se puede seleccionar a partir de Q, P, R, K. El residuo de aminoácido Q se puede usar como el punto de parada, en virtud de su capacidad para formar piroglutamato en presencia de ciltotransferasa de glutamato. En el caso de que el aminoácido N-terminal de la proteína madura no sea en si mismo un residuo que pueda funcionar como una parada, es deseable extender la marca de ADN por un codón que codifica un residuo de parada adecuada, que sea luego fundido a la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada madura. Un residuo de parada preferida a ser adicionado al final de la marca peptídica es Q, puesto que este residuo puede ser quitado del extremo N-terminal de la proteína expresada con aminopeptidasa de piroglutamil después de la escisión de dipeptidil aminopeptidasa de la marca peptídica.

[0024] La marca de ADN, cuando fusionada dentro del marco de lectura a la secuencia codificante de una proteína a ser expresada de forma recombinante, proporciona una proteína marcada cuya marca peptídica tiene un predominio de cadenas laterales polares cargadas. La presencia de residuos adicionales cargados en la proteína contraseñada puede ser particularmente útil en los pasos de purificación posteriores que discriminan basándose en carga de masa de proteína.

[0025] Una molécula de ADN puede comprendiendo una marca de ADN, codificar una marca peptídica según cualquiera catalogada en la tabla 1 teniendo SEC ID Nos: 6-16, fusionada dentro del marco de lectura a una secuencia de ADN que codifica 21 interleuquina de (hIL-21) teniendo SEC ID Nos: 4, como se describe en el ejemplo 1. En una forma de realización la marca de ADN, fusionada dentro del marco de lectura a una secuencia de ADN que codifica hIL-21, es aquella que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre MHAH, MHHA, MHHV, MKHK, MKMK, MKSK, y MKTK; en otra forma de realización, la marca de ADN codifica la secuencia de aminoácidos MKSK.

[0026] La marca de ADN puede tener la secuencia de nucleótidos de constructo DAP 14, 25, 15, 16, 22, 17, 18, 19, 21, 23 y 24 catalogada en la tabla 1, Nos de SEC ID correspondientes a: 17 - 27, respectivamente. Una marca de ADN que tiene cualquiera de estas secuencias de nucleótidos se puede fusionar dentro del marco de lectura a una secuencia de ADN que codifica hIL-21. La marca de ADN, correspondiente a cualquiera de las SEC ID Nos: 17-27 se puede fusionar dentro del marco de lectura a una codificación de molécula de ADN hIL-21 con la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 4. Se debe entender que las secuencias con SEC ID Nos: 17-27 se muestran con una adaptación a inserción en un entorno de Nde1-Sty1. Otros sitios de restricción pueden ser elegidos, y está en las capacidades de un experto en la técnica ajustar las secuencias por consiguiente.

[0027] La marca de ADN puede ser insertada adyacente a, o en un sitio de clonación adecuada del vector o plásmido, de manera que la marca esté localizada abajo y operativamente enlazada a una secuencia del promotor. Preferiblemente la marca de ADN se flanquea por un sitio de escisión de enzima de restricción que facilita la inserción corriente abajo dentro del marco de lectura de una secuencia de ADN que codifica la proteína por ser expresada de forma recombinante. Un experto en la técnica fácilmente reconocerá secuencias flanqueantes adecuadas preferidas para facilitar la clonación dentro del marco de lectura corriente abajo de la secuencia codificante de una proteína deseada. Una secuencia del promotor en el plásmido o vector que sea operativamente enlazada a la marca de ADN tiene una secuencia de nucleótidos que sea capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ADN que codifica la proteína marcada en la célula microbiana huésped seleccionada. Secuencias promotoras, adecuadas para expresión de proteína recombinante en bacterias y en particular en E. coli, se conocen por un experto en la materia, pero incluyen cualquiera de los promotores T7, trc, lac y tac. Un vector que incorpora el cassette de expresión comprendiendo un promotor operativamente enlazado a una marca de ADN puede ser autorreplicante y tener un marcador seleccionable, por ejemplo ampicilina.

[0028] El vector de expresión o plásmido puede comprender además una secuencia de ADN que codifica una proteína a ser expresada recombinantemente, donde la secuencia de ADN es clonada en el sentido indicado y dentro del marco de lectura con dicha marca de ADN. En un ejemplo, la secuencia de ADN clonada en el plásmido de expresión es aquella que codifica hIL-21 que es capaz de expresión como una proteína marcada cuando el plásmido de expresión se introduce en una célula huésped adecuada. La secuencia de ADN que codifica hIL-21 en el vector de expresión o plásmido puede tener la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 4.

[0029] Una célula huésped, a ser transformada con un vector de plásmido de expresión que es conveniente para la

expresión de una proteína marcada, es bien conocida a un experto en la técnica. Una cepa huésped bacteriana preferida es una cepa derivada de E.coli B, por ejemplo la cepa deficitaria de proteasa E. coli BL21 (DE3) que alberga el gen de polimerasa T7 en el cromosoma.

- 5 [0030] Una proteína marcada puede comprender una marca peptídica N-terminal fusionada a una proteína, donde la marca peptídica tiene una secuencia tal y como se define por fórmula I. Dicha marca peptídica tiene al menos cuatro aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de la lista dada en la tabla 1, más preferiblemente una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre MHAH, MHHA, MHHV, MKHK, MKMK, MKSK, y MKTK, y de la forma más preferible la secuencia de aminoácidos MKSK. En una forma de realización la proteína marcada comprende una marca peptídica fusionada a la proteína hIL-21, donde dicha proteína hIL-21 tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 5. La proteína marcada se puede obtener por expresión recombinante. La proteína marcada se puede someter a pasos de purificación, y/o uno o más pasos de tratamiento proteolíticos descritos aquí para la eliminación de la marca peptídica de la proteína marcada para proporcionar una proteína madura con una o más aplicaciones.
- 10
- 15 [0031] Es descrito un método para expresión recombinante en una célula huésped microbiana de una proteína marcada codificada por una marca de ADN fundida dentro del marco de lectura a una secuencia codificante, por la cual la secuencia de ADN fundida codifica dicha proteína marcada, para mejorar el rendimiento de la proteína de objetivo expresada. Por consiguiente, el método incluye los pasos de construcción de un plásmido de expresión o codificación de vector para una proteína de fusión que comprende una marca peptídica N-terminal fusionada a una proteína, por la cual la secuencia codificante se termina por un codón de terminación. Expresión de la proteína marcada se dirige por un promotor operativamente enlazado a la secuencia codificante de la proteína marcada, por la cual el promotor se reconoce por el sistema de expresión de la célula huésped. La construcción de un vector de expresión para la expresión de hIL-21 es descrita en ejemplo 1.
- 20
- 25 [0032] El vector de expresión o plásmido se modifica en una célula huésped microbiana, preferiblemente la bacteria E. coli, y células huéspedes transformadas por el vector son identificadas, aisladas y cultivadas bajo condiciones compatibles con multiplicación de la célula huésped y la expresión de la proteína marcada.
- 30 [0033] Expresión de la proteína marcada en una célula huésped microbiana es preferiblemente inducible. Por ejemplo, donde la célula huésped es una cepa de E. coli, y la expresión se regula por el operador lac, la expresión se puede inducir por adición de aproximadamente 0.5 - 1 mM isopropilo β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) que de-reprime el promotor lac. Después de que una inducción adecuada por IPTG, por ejemplo durante 3-4 horas, las células huéspedes pueden ser lisadas, por ejemplo por sonicación o procedimientos de congelar-descongelar, y el lisado celular separado en fracciones insolubles y solubles por centrifugado. La proteína marcada, dependiente de su solubilidad, se puede localizar en la fracción soluble, o más preferiblemente en cuerpos de inclusión que fraccionan con el granulado celular.
- 35
- [0034] Cuando la proteína marcada se localiza en cuerpos de inclusión, una solubilización y paso de replegado pueden ser requeridos antes de su otra purificación, usando condiciones de utilización optimizadas para la proteína marcada según protocolos bien conocidos en la técnica. Una amplia variedad de protocolos de separación y purificación de proteína se pueden emplear para conseguir el grado requerido de purificación. Métodos para determinar la pureza de la proteína purificada marcada y la proteína posteriormente derivada madura se conocen bien en la técnica, y se ilustran en el ejemplo 2.
- 40
- [0035] La eliminación de la marca peptídica de la proteína marcada puede emplear aminopeptidasa de dipeptidil, que se puede combinar con ciclotransferasa de glutamina si el residuo de parada es Q. La eliminación de la marca puede ser realizada bien antes o después de la purificación de la proteína expresada recombinantemente.
- 45
- [0036] Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente, y patentes citadas aquí son incorporadas por la presente por referencia en su integridad y en la misma extensión como si cada referencia indicada individual y específicamente fuera a ser incorporada por referencia y fueron expuestas en su totalidad aquí (en la extensión máxima permitida por ley), independientemente de cualquier incorporación proporcionada separadamente de documentos particulares mencionados aquí en cualquier otro lugar.
- 50
- [0037] El uso de los términos "un" y "el" y "uno" y similares referentes se deben interpretar para cubrir el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o sean claramente contradichos por el contexto. Por ejemplo, la frase "el compuesto" debe ser entendido como en referencia a varios aspectos particulares o "compuestos" descritos, a menos que se indique lo contrario.
- 55
- [0038] Al no ser que se haya indicado otra cosa, todos los valores exactos provistos aquí son representativos de valores correspondientes aproximados (por ejemplo, de todos los valores ejemplares provistos con respecto a un factor particular o medición se puede considerar que también proporcionan una medición aproximada, modificada por "aproximadamente", donde es apropiado.
- 60
- [0039] La descripción aquí usando términos tales como "comprendiendo", "teniendo", "incluyendo" o "conteniendo" con referencia a un elemento o elementos está destinada a proporcionar soporte para un aspecto similar o aspectos que, "consisten en" "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a
- 65

menos declarado de otra manera o claramente contradicho por el contexto (p. ej., una composición descrita aquí como comprendiendo un elemento particular debería ser entendida como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que declarado de otra manera o claramente contradicho por el contexto).

5 [0040] En resumen, la presente invención describe un vector de expresión o plásmido comprendiendo una marca de ADN que codifica una marca peptídica, que es operativamente enlazada a un promotor capaz de dirigir expresión en una célula huésped microbiana de dicha marca de ADN y cualquier secuencia codificante de proteína fusionada dentro del marco de lectura con dicha marca de ADN. La ventaja particular de utilizar el vector de expresión o plásmido para expresión de proteína recombinante de una secuencia codificante de proteína fusionada dentro del marco de lectura con dicha marca de ADN es que los niveles de expresión en una célula huésped son mejorados significativamente. Así, cuando una proteína es expresada recombinantemente en una célula huésped microbiana, tal como por ejemplo E. coli, con la marca peptídica fusionada en el extremo N-terminal, la presencia de esta marca en la mayoría de los casos realza la expresión, debido a la solubilidad disminuida de la proteína y toxicidad reducida a la célula huésped, y además cumple varios criterios adicionales importantes requeridos para expresión eficaz de proteína recombinante. En particular esto permite que la proteína sea obtenida en su forma madura después de la escisión apropiada de la marca. Por otra parte, la alteración de la carga de proteína global causada por la marca cargada facilita la purificación de la proteína.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1

Expresión de interleuquina-21 humana marcada

25 [0041] Para comparación de varias marcas N-terminales, respecto a la expresión y procesamiento en este sentido, la interleuquina humana hIL-21 fue elegida como proteína objetivo. La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Met hIL-21 se da debajo, donde el extremo 5' y el extremo 3' de la molécula tiene respectivamente sitios de enzima de restricción para Nde1- BamH1.

30 [0042] Secuencia de nucleótidos hIL-21 Nde1- BamH1 [SEC ID n°. 1]:

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

35 [0043] La secuencia de nucleótidos Met hIL-21 Nde1- BamH1 codifica la secuencia de proteína Met hIL-21 [SEC ID n°. 2]:

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

40 [0044] Una serie de constructos fueron hechos según el siguiente esquema:

[0045] Un molécula de ADN de par de bases 410, codificando la forma madura de hIL-21, correspondiendo a residuos de aminoácidos 1- 133 de Met hIL-21, con extremo 5' y 3' sitios Sty1-BamH1 se muestra abajo:

45 [0046] Secuencia de nucleótidos hIL-21 Sty1-BamH1 [SEC ID n°. 3]

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

5 [0047] La secuencia de nucleótidos hIL-21 Sty1-BamH1, arrancando desde nucleótido 2, comprende la secuencia de nucleótidos [SEC ID n°: 4], cuyos códigos para la secuencia de proteína madura hIL-21 con secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 5, donde * corresponde a un codón de parada [SEC ID n°: 5]:

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

10 [0048] La molécula hIL-21 Sty1-BamH1 fue ligada a un vector de expresión Nde1-BamH1 digerido T7 , pET-11c de 5.6 kb, junto con cualquier una serie de enlaces, cada uno flanqueado por un sitio compatible 5' Nde1 y un sitio 3' St1, que son catalogados abajo en la tabla 1:

15 Tabla 1

Nombre del constructo	Secuencia de aminoácidos de marca	Nivel de expresión	Secuencia de ADN de marca*
Met hIL-21	(M)	1-2	Ninguna marca
DAP 14	MHAH [SEC ID n°: 6]	1	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 25	MHAH [SEC ID n°: 7]	4-5	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 15	MHHA [SEC ID n°: 8]	4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 16	MHHQ [SEC ID n°: 9]	3-4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 22	MHHV [SEC ID No:10]	4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 17	MKHK [SEC ID No:11]	4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 18	MKAK [SEC ID No:12]	2-3	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

DAP 19	MRAR [SEC ID No:13]	3	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 21	MKMK [SEC ID No:14]	4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 23	MKSK [SEC ID n°: 15]	6	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).
DAP 24	MKTK [SEC ID No:16]	4	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).

[0049] El vector de expresión T7, pET-11c, comprendiendo un enlazador con una marca de ADN, ligado dentro del marco de lectura a la molécula de ADN, hIL-21 Sty1-BamH1 fue transformado en la célula huésped E. coli B BL21 (DE3).

[0050] Cepas de célula huésped, transformadas con cada uno de los vectores de expresión T7, fueron criadas a 37°C en el medio LB, suplementado con ampicilina 0.2 mg/l, y la expresión de proteína recombinante a partir del vector de expresión T7 fue inducida con 0.5 mM IPTG durante 3-4 horas. Las células huéspedes fueron luego cosechadas por centrifugado, lisadas y luego la muestra fue centrifugada para proporcionar una fracción soluble y una fracción de cuerpo de inclusión granulada. El extracto de célula total, el cuerpo de inclusión y fracción de célula soluble de cada muestra de célula huésped fueron luego separados por SDS PAGE, y los geles fueron manchados con Comassie azul para determinar el nivel relativo de expresión de proteína hIL-21 marcada, en comparación con la proteína no marcada, Met hIL-21.

[0051] El nivel de expresión de las varias versiones marcadas de hIL-21 es dependiente en la secuencia de aminoácidos de la marca, como se muestra en la tabla 1, pero es también en algunos casos dependiente en la secuencia de nucleótidos, como se puede observar en DAP 14 y DAP 25 con secuencias de aminoácido idénticas. En DAP 14, el bajo nivel de expresión es muy probablemente debido a la formación de una estructura de bucle, es decir estructura secundaria, en el ARNm en la región de inicio de traducción, mientras el cambio 3 de los codones en DAP 25 conduce a una estructura más abierta. Está dentro de las habilidades de un experto en la técnica hacer ajustes en los codones para evitar problemas secundarios si encontrados. Tabla 1 ilustra dos puntos: los niveles de expresión son generalmente aumentados por la adición de las marcas peptídicas específicas, y la solubilidad de hIL-21 es disminuida protegiendo así la célula huésped de la E.coli de los efectos venenosos de hIL-21. También, la reducción de solubilidad favorece la subdivisión de hIL-21 en cuerpos de inclusión y facilita así su purificación posterior.

Ejemplo 2

Interleuquina-21 humana expresada recombinantemente marcada se procesa a su forma madura y activa.

[0052] MKHK-hIL-21, constructo expresado usando DAP17, fue redoblado a partir de cuerpos de inclusión como descrito en WO 04/55168 y posteriormente purificado a aproximadamente 90-95% de pureza utilizando cromatografía en columna SP de sefarsa. Una banda simple de polipéptido mayor correspondiente a MKHK-hIL-21 fue detectada por análisis de SDS-PAGE de fracciones obtenidas de la columna SP de sefarsa, como se ha visto en la figura 1, senderos 2-10. Depósitos de fracciones, mostrados en senderos 4-10, fueron posteriormente sometidos a tratamiento de dipeptidil aminopeptidasa (DAPase) y ciclotransferasa de glutamina (Q ciclasa) para llevar a cabo una eliminación controlada de la marca peptídica N-terminal de cuatro aminoácidos. Las condiciones para escisión de marca peptídica fueron: una solución acuosa de 27.5 µM MKHK-IL21, 67.5 mU DAPase it, 5.5 U Q ciclasa, 25 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.0, incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), utilizando enzimas suministradas por Qiagen.com.

[0053] La eficiencia y finalización de eliminación de marca para producir hIL-21 maduro fue determinada por espectrometría de masas, como se muestra en la Figura 2, A y B.

Panel A muestra el espectro Maldi de fracciones antes de la eliminación de la marca

Panel B muestra las mismas fracciones después de eliminación de la marca.

[0054] HIL21 nativo tiene un peso molecular de 15433 Da, mientras el MKHK-IL21 tiene un peso molecular de 15975 Da.

Como observado en el panel B, escisión y eliminación de marca fueron completadas aproximadamente al 90%.

[0055] Actividad biológica como evaluada en un ensayo BaF (ensayo 1) usando el receptor IL-21 mostró que la potencia del nativo IL-21 dividido fue equipotente a Met-IL21 producido por los métodos descritos en WO 04/55168.

Métodos farmacológicos

Ensayo (I) ensayo BAF-3 para determinar la actividad IL-21

- 5 [0056] Las células BAF-3 (una línea celular linfóide murina pro-B derivada de la médula ósea) eran originalmente dependientes de IL-3 para crecimiento y supervivencia. IL-3 activa JAK-2 y STAT que son los mismos mediadores que IL-21 está activando después de la estimulación. Después de la transfección del receptor humano IL-21 la línea celular entró en una línea celular IL-21-dependiente. Este clon puede utilizarse para evaluar el efecto de muestras IL-21 en la supervivencia de células BAF-3.
- 10 [0057] Las células BAF-3 se cultivan en el medio de inanición (medio de cultivo sin IL-21) durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂.
- 15 [0058] Las células son lavadas y resuspendidas en el medio de inanición y sembradas en placas. 10 µl de compuesto IL-21, IL-21 humana en diferentes concentraciones o control se añaden a las células, y las placas se incuban durante 68 horas a 37°C, 5% CO₂.
- 20 [0059] AlamarBlue® se añade a cada bien y las células son luego incubadas durante otras 4 horas. El AlamarBlue® es un indicador de redox, y se reduce por reacciones innatas para metabolismo celular y, por lo tanto, proporciona una medida indirecta de varias células viables.
- 25 [0060] Finalmente, la actividad metabólica de las células se mide en un lector de placa de fluorescencia. La absorbencia en las muestras se expresa en % de células no estimuladas con compuesto de hormona de crecimiento o control y a partir de la respuesta de concentración la curva de la actividad (cantidad de un compuesto que estimula las células con 50%) puede ser calculada.

Listado de secuencias

- 30 [0061]
- <110> Novo Nordisk A/S
- <120> expresión de proteínas en E. COLI
- 35 <130> 7205.204-wo
- <160> 27
- 40 <170> Versión de patentIn 3.3
- <210> 1
- <211> 423
- <212> ADN
- 45 <213> homo sapiens
- <400> 1

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

5
<210> 2
<211> 134
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

10
<210> 3
<211> 418
<212> ADN
<213> homo sapiens

15
<400> 3

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

5 <210> 4
<211> 405
<212> ADN
<213> homo sapiens

10 <400> 4

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

15 <210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

20

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

5 <210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> DAP 14

<400> 6

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

15

20 <210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> DAP 25

25 <400> 7

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

30

35 <210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 375 573 T3

<220>
<223> DAP 15

5 <400> 8

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> DAP 16

15 <400> 9

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

<210> 10
20 <211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> DAP 22

<400> 10

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

30 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> DAP 17

40 <400> 11

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

<210> 12
45 <211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> DAP 18

<400> 12

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

55 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 375 573 T3

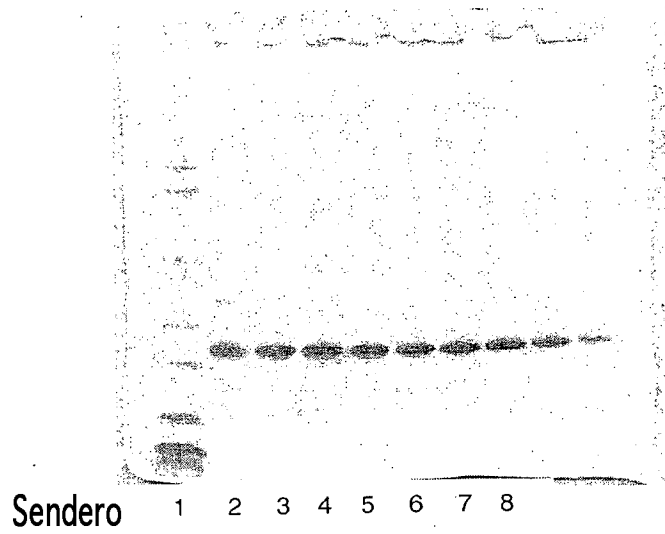
	<220>	
	<223> DAP 19	
5	<400> 13	
	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).	
	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).	
10	<210> 14	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> DAP 21	
	<400> 14	
	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).	
20	<210> 15	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> DAP 23	
	<400> 15	
30	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).	
	<210> 16	
	<211> 4	
35	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> MKTK	
40	<400> 16	
	Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (Uncompressed).	
45	<210> 17	
	<211> 13	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> DAP 14	
55	<400> 17	
	Tatgcatgcg cat	13
	<210> 18	
	<211> 13	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> DAP 25	
	<400> 18	
	Tatgcacgct cac	13
10	<210> 19	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> DAP 15	
	<400> 19	
20	Tatgcatcac gcg	13
	<210> 20	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> DAP 16	
	<400> 20	
30	Tatgcatcac cag	13
	<210> 21	
	<211> 13	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> DAP 22	
40	<400> 21	
	Tatgcatcac gtg	13
	<210> 22	
	<211> 13	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> DAP 17	
50	<400> 22	
	Tatgaaacac aaa	13
	<210> 23	
55	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> DAP 18	
	<400> 23	
	tatgaaagcg aaa	13
65	<210> 24	
	<211> 13	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> DAP 19	
	<400> 24	
	tatgcgtgcg cgt	13
10	<210> 25	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> DAP 21	
	<400> 25	
20	tatgaaaatg aaa	13
	<210> 26	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> DAP 23	
	<400> 26	
30	tatgaaaagc aaa	13
	<210> 27	
	<211> 13	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> DAP 24	
40	<400> 27	
	tatgaaaacc aaa	13

REIVINDICACIONES

- 5 1. Plásmido de ADN autorreplicante para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana comprendiendo una marca de ADN con una secuencia de nucleótidos que codifica una marca peptídica de la fórmula MKMK, MKTK o MKSK, donde dicho ADN es operativamente enlazado a una secuencia del promotor.
- 10 2. Plásmido de ADN autorreplicante para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana comprendiendo una marca de ADN, donde dicha marca de ADN codifica al menos cuatro residuos de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº. 15.
- 15 3. Plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, comprendiendo además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína fundida dentro del marco de lectura con dicha marca de ADN para expresión recombinante de una proteína marcada N-terminal codificada por dicho ácido nucleico fundido a dicha marca de ADN.
4. Plásmido según la reivindicación 3, donde dicha proteína tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5.
- 20 5. Plásmido según la reivindicación 3 o 4, donde dicha secuencia de ácidos nucleicos codificando una proteína consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 4.
6. Célula huésped microbiana comprendiendo el plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
- 25 7. Célula huésped microbiana según la reivindicación 6, donde dicha célula es E. coli.
8. Proteína marcada comprendiendo una marca peptídica N-terminal fundida a una proteína, donde dicha marca tiene al menos cuatro residuos de aminoácidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID NOs: 14, 15 y 16.
- 30 9. Proteína marcada según la reivindicación 9, donde dicha marca peptídica tiene al menos cuatro residuos de aminoácidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOs: 15.
- 35 10. Proteína marcada según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde dicha proteína tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5.
11. Método para expresión recombinante de una proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana comprendiendo las etapas de:
- 40 a. construcción de un plásmido recombinante comprendiendo inserción de una secuencia de ADN que codifica una proteína dentro del marco de lectura y 3' a la marca de ADN del plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, e
- 45 b. introducción de dicho plásmido recombinante en una célula huésped microbiana, e
- c. inducción de expresión de dicha proteína marcada en el extremo N-terminal en una célula huésped microbiana.



ES 2 375 573 T3

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).