(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 391 457**

(51) Int. Cl.:
***C12P 21/00*** (2006.01)
***C07K 14/56*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04764055 .2**
(96) Fecha de presentación: **12.08.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1656455**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la purificación de polipéptidos recombinantes**

(30) Prioridad:
**13.08.2003 US 494915 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**26.11.2012**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**26.11.2012**

(73) Titular/es:
**SANDOZ AG (100.0%)**
**LICHTSTRASSE 35**
**4056 BASEL, CH**

(72) Inventor/es:
**STEMPFER, GÜNTER;**
**ALLIGER, PETER y**
**PALMA, NORBERT**

(74) Agente/Representante:
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 391 457 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de polipéptidos recombinantes

Esta invención trata de un método para la preparación de un polipéptido recombinante de interés, polipéptido que durante la expresión se ha secretado en el periplasma de una célula huésped transformada.

En particular, esta invención trata de métodos para preparar y purificar un interferón α2 humano recombinante.

Pueden producirse polipéptidos o proteínas, como interferones del grupo del interferón α2, mediante tecnología de DNA recombinante usando células bacterianas (p. ej. Escherichia coli) como huéspedes. Así, las células bacterianas pueden transformarse con DNA plasmídico que codifica dicho polipéptido. De ese modo, se permite que las bacterias expresen cantidades del polipéptido bien en el citoplasma o bien en el periplasma. Como las bacterias pueden desarrollarse en grandes cantidades usando procedimientos de fermentación a gran escala, de este modo es posible producir grandes cantidades del polipéptido.

Aunque pueden emplearse técnicas recombinantes para producir altos rendimientos de un polipéptido bruto de interés, el aislamiento y la purificación del polipéptido no es un asunto simple. En un procedimiento de aislamiento típico, un caldo de fermentación se neutraliza, por ejemplo mediante acidificación o calentamiento. Posteriormente, las células bacterianas se retiran para dejar un sobrenadante líquido, que contiene subproductos solubles no deseados, que se descarta. La masa de células bacterianas resultante se resuspende en un medio apropiado, p. ej. un tampón adecuado, y las células se rompen para extraer y aislar el interferón bruto. Este laborioso procedimiento se lleva a cabo a fin de separar el polipéptido de interés de tantos subproductos de fermentación y otros contaminantes como sea posible para asegurar que las etapas de purificación posteriores (que implican la separación cromatográfica) avancen de un modo tan eficaz como sea posible.

La naturaleza laboriosa de este procedimiento de la técnica anterior puede conducir a rendimientos inferiores de polipéptido de interés extraído y costes de producción superiores. De acuerdo con esto, sigue habiendo una necesidad de un procedimiento que permita la preparación de un polipéptido recombinante de interés a partir de células bacterianas de un modo productivo y económico.

Ejemplos de procedimientos de la técnica anterior son como sigue:

Hart et ál. describen el aislamiento in situ de IGF-I periplásmico de E. coli. El IGF-I se solubilizaba mediante caótropos y reductores bajo condiciones alcalinas (Hart, R.A., Lester, P.M., Reifsnyder, D.H., et ál. (1994). Bio/Technology, vol. 12, pp. 1113-1117). Se diseñaba un sistema bifásico acuoso para mejorar la centrifugación posterior y el rendimiento de recuperación.

Dalmora et ál. describen el uso de choque osmótico en un procedimiento analítico a pequeña escala (Dalmora et ál. (1997). Journal of Chromatography A, vol. 782, pp. 199-210). Antes de aplicar un choque osmótico, las células se separaban del caldo de fermentación mediante centrifugación.

En el contexto de la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que es posible una extracción y un aislamiento eficaz de un polipéptido recombinante de interés, por ejemplo de un interferón α2 recombinante, de una célula huésped que comprende un periplasma, como una célula bacteriana gramnegativa, realizando directamente un choque osmótico sobre las células huésped que comprenden un polipéptido recombinante de interés expresado en su periplasma, omitiendo de ese modo las susodichas etapas de separación y resuspensión. Al realizar tal procedimiento la membrana celular externa de la célula huésped se rompe suficientemente para liberar el contenido de su periplasma al medio de fermentación.

Por lo tanto, puede evitarse la liberación de material citoplásmico no deseado, p. ej. proteínas y DNA de las células huésped, en la fracción de residuo celular. Sorprendentemente, la purificación cromatográfica posterior no se compromete, sino que conduce fácilmente a rendimientos y/o pureza superiores del polipéptido recombinante que va a aislarse.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado además que una secuencia única de etapas cromatográficas, en particular si se combina con el susodicho procedimiento de extracción / ruptura, conduce a rendimientos y/o pureza superiores de un interferón α2 recombinante.

De acuerdo con esto, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un polipéptido recombinante de interés, que comprende

(i) fermentación de una célula huésped procariótica que comprende un periplasma y que está transformada con un sistema de expresión recombinante capaz de producir la secreción de un polipéptido de interés en el

periplasma de dicha célula huésped, donde dicha fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el polipéptido de interés se secrete al periplasma de la célula huésped,

(ii) extracción del polipéptido de interés del periplasma aplicando un choque osmótico a las células huésped contenidas en el medio de fermentación,

en el que dicho choque osmótico se realiza mediante la adición de sacarosa directamente al medio de fermentación y la posterior dilución con $H_2O$ de modo que la membrana celular externa de la célula huésped se rompa suficientemente para liberar el contenido de su periplasma en el medio de fermentación.

Sistemas de expresión periplásmica recombinantes adecuados, en particular vectores de expresión, y células huésped procarióticas correspondientes así como métodos de fermentación apropiados son muy conocidos en la técnica. Ejemplos adecuados se describen posteriormente en la sección de Ejemplos.

En una de sus realizaciones preferidas, dicho choque osmótico se realiza mediante la adición de un agente directamente al medio de fermentación, donde dicho agente es capaz de crear después de la dilución con $H_2O$ una presión osmótica que conduce a la rotura de la membrana celular externa de la célula huésped, y la dilución posterior con $H_2O$.

El agente es de sacarosa. Opcionalmente, un componente formador de complejos, como EDTA, puede añadirse adicionalmente al medio de fermentación.

El agente está presente en tal concentración que, durante la dilución del medio de fermentación con $H_2O$, se produce un choque osmótico que conduce a la ruptura de la membrana celular externa de la célula huésped con la liberación posterior del polipéptido de interés expresado.

En particular, en una realización preferida adicional de la presente invención, la concentración de la sacarosa en el medio de fermentación cuando comienza la dilución es aproximadamente 20% en peso/volumen. Preferiblemente, el factor de dilución del caldo de fermentación que contiene sacarosa con $H_2O$ es al menos 3 veces.

En el contexto de la presente invención, una célula huésped procariótica preferida que comprende un periplasma es una bacteria gramnegativa. Preferiblemente, la bacteria gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en Escherichia coli, una especie de Pseudomonas, una especie de Enterobacter, una especie de Campylobacter y una especie de Vitreoscilla. En la realización más preferida de la presente invención, la célula huésped es E. coli.

Después de la etapa de ruptura de las células, el caldo de fermentación, que es una preparación bruta del polipéptido recombinante de interés, puede someterse a una etapa de separación, p. ej. centrifugación a alta velocidad, a fin de que el residuo celular y otra materia en partículas pueda separarse del extracto que contiene el polipéptido de interés. Para ayudar en la separación de materia en partículas del extracto se prefiere añadir al caldo de fermentación antes de la etapa de separación un agente precipitante adecuado. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que la polietilenimina es un agente precipitante particularmente bueno para esta etapa. La polietilenimina se emplea preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,05% y en un medio cuyo pH se ajusta hasta aproximadamente 7,5, p. ej. de 7,3 a 7,7.

El procedimiento de la presente invención se puede utilizar en la producción de una gran variedad de polipéptidos de interés. En particular, según la presente invención, el polipéptido de interés se puede seleccionar del grupo que consiste en un interferón, una interleucina, una hormona del crecimiento, un factor de crecimiento, una citocina, una enzima, un inhibidor de enzima, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo, y similares, por ejemplo interferón α2A, interferón α2B, interleucina-3, interleucina-6, hormona del crecimiento humana, insulina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, factor estimulante de colonias de macrófagos, interferón β1, somatropina bovina, somatropina porcina, interleucina-11, interleucina-2, un fragmento Fab y péptidos pequeños tales como calcitonina, hormona paratiroidea (PTH) o un glucagón. Preferiblemente, dentro del alcance de la presente invención, el polipéptido de interés es un interferón 2 humano, en particular interferón α2A humano o interferón α2B humano, recombinante, siendo el último particularmente preferido para ser el polipéptido de interés.

El extracto que comprende el polipéptido de interés puede contener un número de impurezas, por ejemplo proteínas de células huésped y DNA de células huésped que tienen que retirarse antes de que el interferón pueda formularse como una forma de dosificación acabada. Típicamente, el polipéptido se purifica mediante técnicas de precipitación y separación cromatográfica, que son conocidas de por sí. Por ejemplo, el polipéptido puede purificarse usando una separación cromatográfica en varias etapas.

Sin embargo, dependiendo de la naturaleza del polipéptido de interés, el procedimiento se complica por la necesidad de etapas de diálisis y/o concentración significativas intercaladas entre las etapas cromatográficas. Estas etapas

adicionales son laboriosas y pueden conducir a rendimientos inferiores y costes de producción superiores.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que una purificación cromatográfica en varias etapas de una preparación bruta, en particular preparada como se describe anteriormente, de interferón α2 recombinante, puede llevarse a cabo sin etapas de diálisis o concentración mediante la selección y la ordenación acertadas de ciertas etapas cromatográficas.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un interferón α2 recombinante, que comprende

(a) obtener una preparación bruta de un interferón α2 recombinante,

(b) aplicar la preparación bruta a una cromatografía en varias etapas que comprende las siguientes etapas en secuencia:

(i) cromatografía de intercambio catiónico,

(ii) cromatografía de intercambio aniónico,

(iii) cromatografía de interacción hidrófoba,

(iv) cromatografía de intercambio catiónico,

(v) cromatografía de exclusión por tamaño.

En una de sus realizaciones preferidas, la preparación bruta del interferón α2 recombinante se obtiene mediante un procedimiento que comprende

(a) fermentación de un célula huésped procariótica que comprende un periplasma y que se transforma con un sistema de expresión recombinante capaz de producir la secreción de un interferón α2 recombinante al periplasma de dicha célula huésped, donde dicha fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el interferón α2 recombinante se secrete al periplasma,

(b) extracción del interferón α2 recombinante del periplasma aplicando un choque osmótico a las células huésped contenidas en el medio de fermentación.

Según se menciona en la presente memoria, sistemas de expresión, en particular vectores de expresión, periplásmica recombinantes adecuados y células huésped procarióticas correspondientes así como métodos de fermentación apropiados son muy conocidos en la técnica. Ejemplos adecuados se describen posteriormente en la sección de Ejemplos.

Preferiblemente y según se menciona anteriormente, dicho choque osmótico se realiza mediante la adición de un agente directamente al medio de fermentación, donde dicho agente es capaz de crear después de la dilución con $H_2O$ una presión osmótica que conduce a la ruptura de la membrana celular externa de la célula huésped, y la dilución posterior con $H_2O$.

El agente es sacarosa. Opcionalmente, un componente formador de complejos, como EDTA, puede añadirse opcionalmente al medio de fermentación.

Según se menciona en la presente memoria, el agente está presente en una concentración tal que, al diluir el medio de fermentación con $H_2O$, produce un choque osmótico que conduce a la ruptura de la membrana celular externa de la célula huésped con liberación posterior del polipéptido de interés expresado.

Preferiblemente, la concentración de la sacarosa en el medio de fermentación cuando se comienza la dilución es aproximadamente 20% en peso/volumen. En una de sus realizaciones preferidas, el factor de dilución para el caldo de fermentación que contiene sacarosa con $H_2O$ es de al menos 3 veces.

Según se menciona en la presente memoria, una célula huésped procariótica preferida es una bacteria gramnegativa, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en Escherichia coli, una especie de Pseudomonas, una especie de Enterobacter, una especie de Campylobacter y una especie de Vitreoscilla, prefiriéndose particularmente E. coli.

Dicho interferón α2 se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en interferón α2A e interferón α2B. En la

realización más preferida, dicho interferón α2 es interferón α2B.

En el método de extracción descrito anteriormente en la presente memoria es posible obtener un extracto bruto transparente que contiene el interferón α2 recombinante. El extracto que contiene polipéptido tendrá un alto contenido del interferón α2 en forma altamente purificada.

Al llevar a cabo la etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX), el pH del extracto crudo que contiene interferón α2 obtenido de la etapa de extracción puede ajustarse hasta un pH de aproximadamente 4,8 a 5,5 y opcionalmente puede hacerse pasar a través de un sistema de filtración (p. ej. un sistema de filtración de 0,3 micrómetros). El extracto tratado se eluye a continuación en una columna de CEX. Cualquier columna de intercambio catiónico conocida en la técnica puede ser útil para separar el interferón α2 extraído de las impurezas. Preferiblemente, sin embargo, la columna se rellena con S Ceramic Hyper D F. El eluyente de equilibrado es preferiblemente acetato sódico (20 mM) + NaCl (70 mM) a un pH de 5,0. El interferón se hace pasar por la columna usando preferiblemente un gradiente por etapas con NaCl 175 mM.

El pH de la fracción que contiene interferón α2 deseada eluida de la columna de CEX puede ajustarse hasta de aproximadamente 7,3 a 7,7 con un material alcalino apropiado, p. ej. hidróxido sódico, y la conductividad de la fracción puede ajustarse hasta de aproximadamente 3,5 a 4,5 mS/cm mediante dilución usando agua purificada.

Posteriormente, la fracción se alimenta a una columna de intercambio aniónico para efectuar el procedimiento de la etapa ii). Cualquier columna de intercambio aniónico conocida en la técnica puede ser útil para separar el interferón extraído de las impurezas. Preferiblemente, sin embargo, la columna se rellena con resina Ceramic Q HyperD F. El equilibrado es preferiblemente Tris-HCl 20 mM a pH 7, y así a caudales altos, p. ej. 4 - 8 cm/min. La fracción de interferón deseada puede eluirse después de lavar la columna con tampón de equilibrado añadiendo un soluto iónico adecuado, p. ej. cloruro sódico a una concentración de hasta 1000 mM, preferiblemente 150 mM. La temperatura a la que se pone en marcha la separación es preferiblemente de 10°C a 15°C.

Esta etapa de intercambio aniónico es muy eficaz y la pureza del interferón en la fracción de interferón resultante de la etapa ii) puede ser mayor de 40% según se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

Después de la terminación de la etapa ii) la fracción de interferón todavía puede estar contaminada con proteínas de la célula huésped. De acuerdo con esto, la etapa iii) en el procedimiento de purificación es una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y está adaptada para retirar, entre otras cosas, cantidades sustanciales de estas proteínas. La etapa se lleva a cabo en una columna rellena con una resina adecuada para este propósito. Preferiblemente, la resina es 15PHE (Pharmacia). En una etapa iii) preferida la fracción de interferón que va a eluirse en la columna se diluye en primer lugar (1:1) con una solución de sulfato sódico hasta una concentración de sulfato sódico 0,5 M. Posteriormente, el pH de la fracción se ajusta hasta aproximadamente 7,3 a 7,7 con un ácido o una base adecuados, p. ej. NaOH o HCl. Esta solución con pH ajustado se añade a la columna de HIC. Después de una etapa de lavado, el interferón se eluye con un gradiente lineal de sulfato sódico, preferiblemente sulfato sódico 800 a 0 mM. Se recogen y se reúnen las fracciones que tienen una pureza de más de o igual a 93% del área de interferón y ninguna impureza simple que tenga más de o igual a 3% del área según HPLC en fase inversa IPC. Las fracciones reunidas pueden usarse inmediatamente en la siguiente etapa.

La etapa iv) es una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) adicional que sirve para retirar DNA residual y proteínas de la célula huésped residuales que pueden haberse arrastrado de etapas previas.

Una columna de CEX se rellena con un material de relleno adecuado, p. ej. Toyopearl SP-650 S (TosoHaas). En una etapa iv) preferida, la fracción obtenida de la etapa iii) puede diluirse con agua purificada hasta una conductividad final de aproximadamente 7,5 a 8,5 mS/cm, ajustarse hasta un pH de 4,3 a 4,7 con, por ejemplo, ácido acético al 99-100%, y aplicarse a la columna. La columna se lava y posteriormente el interferón α2 se eluye durante un gradiente lineal de cloruro sódico (NaCl 0-300 mM) con NaCl aproximadamente 250 mM. Las fracciones eluidas que tienen una pureza de más de o igual a 95% del área del pico principal de interferón y ninguna impureza simple mayor que o igual a 3% del área según se mide mediante HPLC en fase inversa IPC pueden recogerse y procesarse inmediatamente en la siguiente etapa de purificación.

La etapa v) es una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño que se emplea para retirar dímeros y cualesquiera otros agregados y, cuando sea aplicable, también para realizar un cambio de tampón que puede ser necesario antes de que el producto de interferón pueda formularse como una forma de dosificación acabada.

Cualquier columna y material de relleno adecuados para la filtración en gel pueden emplearse en esta etapa final. Preferiblemente, el material de relleno empleado es Superdex 75pg. El material de relleno se elige por sus buenas capacidades de resolución incluso con volúmenes de carga relativamente altos de, por ejemplo, aproximadamente 5 a 15%. Preferiblemente, la columna se equilibra con un tampón de equilibrado antes de cargarse con la fracción de

interferón procedente de la etapa iv) previa. Posteriormente, la fracción de interferón se eluye de la columna usando un tampón adecuado que consiste preferiblemente en fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 130 mM y EDTA 0,3 mM a un pH de 7,1 - 7,7 para proporcionar la solución a granel final que contiene el producto de interferón α2.

El procedimiento que se describe anteriormente en la presente memoria constituye un procedimiento eficaz para obtener un producto de interferón α2 que es aplicable a escala industrial. Es posible obtener rendimientos del producto de interferón que superan 100 mg por litro de caldo de fermentación.

El polipéptido de interferón α2 de la presente invención puede formularse como formas de dosificación acabadas adecuadas para la administración a seres humanos. Las formulaciones que contienen productos de interferón α2 de la presente invención pueden formularse como formulaciones inyectables. Las formulaciones inyectables pueden proporcionarse como productos liofilizados que deben reconstituirse con agua antes de la administración. Alternativamente, las formulaciones inyectables pueden proporcionarse como inyectables para soluciones como preparaciones de monodosis o multidosis. Adicionalmente, las formulaciones inyectables pueden comprender excipientes comúnmente conocidos en la técnica.

Tales formulaciones son útiles en el tratamiento de la hepatitis C. La dosificación puede depender de diversos factores tales como el método de administración, la edad y/o el estado individual.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, sin limitar de ningún modo su alcance. La materia divulgada en los ejemplos se refiere a realizaciones preferidas de la presente invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Construcción de una cepa de células huésped para la producción de interferón α2B humano recombinante (rhIFNα2B)**

1.1 Consideraciones generales

El polipéptido rhIFNα2b (interferón-α2b humano recombinante) se produce en la cepa de *Escherichia coli* K-12 W3110 transformada con un plásmido que contiene un gen sintético optimizado que codifica rhIFNα2b. rhIFNα2b se produce bajo el control del promotor y el sitio de unión al ribosoma (RBS) del gen de glutaril 7-ACA acilasa (gac) procedente de *Pseudomonas diminuta* CCM 3987 mediante la fermentación de *E. coli* K-12 recombinante. rhIFNα2b se expresa como una proteína de fusión N-terminal con la secuencia de señal procedente del mismo gen (*gac*), dirigiendo la proteína al periplasma con procesamiento (escisión) simultáneo de la secuencia de señal. Por lo tanto, el procedimiento de fermentación da directamente rhIFNα2b maduro con una secuencia primaria idéntica a la de interferón α2b humano presente en la naturaleza. El plásmido de expresión se denomina pMG414, la cepa de producción W3110[pMG414].

1.2 Construcción del vector de expresión pMG414

pUC19 sirve como el punto de partida para la construcción del plásmido vectorial. pUC19 es un plásmido de alto número de copias frecuentemente usado y caracterizado a fondo. Contiene un origen de replicación muy eficaz y un gen de resistencia a ampicilina (*amp* o *bla*) (Yanisch-Perron et ál., 1985; Vieira y Messing, 1982; números de registro del GenBank L09137 y X02514). Aunque pUC19 se usa frecuentemente para la construcción de plásmidos de expresión, el gen amp puede no ser un marcador seleccionable ideal con propósitos industriales. Por esta razón, el promotor y la región codificante del gen *amp* se retiran y se reemplazan por el promotor y la región codificante del gen de resistencia a tetraciclina (*tet*) procedente del plásmido de seguridad bien conocido pBR322 (Bolivar et ál., 1977a, 1977b, 1978; revisión: Balbás et ál., 1986; números de registro del GenBank J01749, K00005, L08654, M10283, M10286, M10356, M10784, M10785, M10786, M33694, V01119). Este trabajo de clonación se realiza con la ayuda de técnicas de PCR de alta fidelidad.

Para conseguir esto, el fragmento que abarca los pb 1743 a 679 de pUC19 se amplifica usando PCR de alta fidelidad (sistema Pwo DNA Polymerase de Roche Biochemicals) y los siguientes oligonucleótidos 5'-fosforilados:

Oligo 235: 5'- Fosfato - TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTC -3' (SEQ ID NO 1)

Oligo 236: 5'- Fosfato - GCGTTTCGGT GATGACGGTG -3' (SEQ ID NO 2)

El fragmento de PCR resultante tiene 1624 pb de longitud y contiene el esqueleto de pUC19 completo que carece del promotor y la secuencia codificante de *amp*, pero que incluye el codón de parada y el terminador de la transcripción procedentes del gen *amp*.

Según se menciona anteriormente, el promotor y la secuencia codificante de *tet* (excluyendo el codón de parada) se amplifican a partir de pBR322. De nuevo, se usó PCR de alta fidelidad para amplificar los pb 4 a 1273 de pBR322. Los siguientes oligonucleótidos 5'-fosforilados se usaron para esta amplificación:

Oligo 237: 5'- Fosfato - TCATGTTTGA CAGCTTATCA TCG -3' (SEQ ID NO 3)

Oligo 238: 5'- Fosfato - GGTCGAGGTG GCCCGGCTC -3' (SEQ ID NO 4)

El fragmento de PCR resultante tiene 1270 pb de longitud. Los dos fragmentos de PCR se purifican mediante electroforesis en gel de agarosa preparativa y se ligan usando DNA ligasa de T4 (Rapid DNA Ligation Kit, Roche Biochemicals). El DNA ligado se purifica y se somete a electroporación en *Escherichia coli* K-12 DH10B (células electrocompetentes Life Technologies ElectroMAX DH10B, genotipo: $F^-$ *mcr*A Δ(*mrr*-hsdRMS-*mcr*BS) φ80d*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 deoR recA1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara*, *leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rps*L *nup*G). Las células transformadas se cultivan en placa sobre agar LB, 15 mg/l de tetraciclina y 3 g/l de glucosa. Los cultivos líquidos se desarrollan en caldo LB que contiene 15 mg/l de tetraciclina y 3 g/l de glucosa y el DNA plasmídico se aísla de estos cultivos usando métodos de minipreparación estándar. Los DNA plasmídicos se analizan mediante análisis de restricción para la integración correcta del fragmento de *tet* en el esqueleto de pUC19. Puesto que la integración del fragmento era inespecífica con respecto a la orientación, sólo aproximadamente 50% de todo clon que contenía inserto tenía el fragmento insertado en la orientación correcta, es decir, el gen *tet* marcha en la misma dirección que el gen amp en pUC19. Una cantidad mayor de DNA se aísla de cultivos líquidos de unos pocos clones y se somete a análisis de restricción más detallados. De aquellos clones que muestran patrones de restricción correctos, se selecciona uno para el trabajo de clonación adicional.

El plásmido respectivo se denominó pMG402. Es idéntico a pUC19 en todas las características y funciones excepto por el hecho de que debe desarrollarse sobre/en medio que contiene tetraciclina en lugar de medio que contiene ampicilina. De este modo, se genera un vector de alto numero de copias resistente a *tet* adecuado con propósitos industriales.

Características del plásmido pMG402:

pb 1954-680: esqueleto de pUC19 (= pUC19 que carece del promotor y el gen estructural de amp)

pb 681-1953: promotor de *tet* y gen estructural procedente de pBR322

rhIFNα2b se expresa como una fusión N-terminal con la secuencia de señal de glutaril 7-ACA acilasa procedente de *Pseudomonas diminuta* CCM 3987 (gac1ss = SEQ ID NO 5) que dirige la proteína al periplasma con procesamiento (escisión) simultáneo de la secuencia de señal por el aparato de peptidasa de señalización de la célula huésped.

Secuencia de aminoácidos de gac1ss (27 aa): MLRVLHRAAS ALVMATVIGL APAVAFA

En la región 3' de la secuencia codificante del gac1ss se introduce un sitio de endonucleasa de restricción Sac II a través del cebador de PCR 3' creando una mutación silenciosa (secuencia de aminoácidos inalterada). Este sitio Sac II permite la fusión de la región codificante de gac1ss con el gen de rhIFNα2b.

El gen estructural para rhIFNα2b se sintetiza químicamente. Difiere de la secuencia de cDNA humano natural en 48 de 165 codones y está diseñado para eliminar cualesquiera codones débiles y tendentes a errores.

En la siguiente tabla, se indican cambios de codones. En la tabla, "Codón natural" se refiere a la secuencia de cDNA publicada por Streuli et ál., 1980 (Número de Registro del GenBank V00548). Los números de aminoácido se refieren a hIFNα2b maduro (partiendo de Cys 1). La secuencia de aminoácidos que va a ser codificada por el gen sintético se toma de la base de datos SwissProt, Número de registro P01563/P01564 (aminoácidos 24 a 188).

| **Intercambio nº** | **Aminoácido** | **Codón natural** | **Codón sintético** | **Intercambio nº** | **Aminoácido** | **Codón natural** | **Codón sintético** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Cys 1 | TGT | TGC | **25** | Leu 80 | CTC | CTG |
| 2 | Pro 4 | CCT | CCG | **26** | Leu 81 | CTA | CTT |
| 3 | Arg 12 | AGG | CGG | **27** | Leu 88 | CTC | CTG |

(continuación)

| Intercambio nº | Aminoácido | Codón natural | Codón sintético | Intercambio nº | Aminoácido | Codón natural | Codón sintético |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Arg 13 | AGG | CGA | **28** | Asn 93 | AAT | AAC |
| 5 | Leu 17 | CTC | CTT | **29** | Cys 98 | TGT | TGC |
| 6 | Arg 22 | AGG | CGG | **30** | Ile 100 | ATA | ATC |
| 7 | Arg 23 | AGA | CGA | **31** | Gly 102 | GGG | GGT |
| 8 | Ser 28 | TCC | TCT | **32** | Gly 104 | GGG | GGT |
| 9 | Leu 30 | TTG | TTA | **33** | Thr 106 | ACA | ACT |
| 10 | Asp 32 | GAC | GAT | **34** | Pro 109 | CCC | CCG |
| 11 | Arg 33 | AGA | CGA | **35** | Ser 115 | TCC | TCT |
| 12 | Phe 36 | TTT | TTC | **36** | Arg 120 | AGG | CGA |
| 13 | Gly 37 | GGA | GGT | **37** | Arg 125 | AGA | CGG |
| 14 | Phe 38 | TTT | TTC | **38** | Leu 128 | CTC | CTG |
| 15 | Pro 39 | CCC | CCG | **39** | Pro 137 | CCT | CCG |
| 16 | Phe 43 | TTT | TTC | **40** | Cys 138 | TGT | TGC |
| 17 | Gly 44 | GGC | GGT | **41** | Arg 144 | AGA | CGA |
| 18 | Pro 54 | CCT | CCG | **42** | Arg 149 | AGA | CGG |
| 19 | Val 55 | GTC | GTA | **43** | Phe 151 | TTT | TTC |
| 20 | Leu 56 | CTC | TTG | **44** | Ser 154 | TCA | TCT |
| 21 | Asn 65 | AAT | AAC | **45** | Thr 155 | ACA | ACC |
| 22 | Leu 66 | CTC | CTG | **46** | Ser 160 | AGT | TCT |
| 23 | Thr 69 | ACA | ACT | **47** | Arg 162 | AGA | CGA |
| 24 | Ser 72 | TCA | TCT | **48** | Ser 163 | AGT | AGC |

El gen resultante permite la transcripción y la traducción eficaces y precisas de rhIFNα2b en *Escherichia coli*. Puesto que el gen está diseñado para la expresión en un sistema bacteriano, no contiene secuencias no traducidas (introns, etc.).

El gen estructural se sintetiza químicamente. En resumen, se sintetizan oligonucleótidos complementarios solapados de aproximadamente 30 a 50 nucleótidos de longitud de un modo que cubre ambas hebras de la secuencia del gen estructural sin huecos. Los oligonucleótidos se hibridan entre sí y se ligan usando DNA ligasa de T4. El producto de reacción se corta con endonucleasas de restricción y se clona en el vector pUC18. El plásmido resultante se somete a secuenciación y muestra la secuencia correcta.

El gen sintético en este plásmido no contiene la secuencia de señal de *gac*. Esta parte de la región codificante se introduce a través del fragmento de gac que contiene promotor, RBS y secuencia de señal y se fusiona con el gen

estructural rhIFNα2b.

El fragmento de *gac* se genera mediante síntesis química. Por ejemplo, se sintetizan oligonucleótidos complementarios solapados de aproximadamente 30 a 50 nucleótidos de longitud de un modo que cubre la longitud total de ambas hebras del fragmento de *gac* (incluyendo los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción sobre ambos lados más un mínimo de 6 pares de bases adicionales para permitir una escisión eficaz) sin huecos. A continuación, los oligonucleótidos se hibridan entre sí (p. ej. mediante calentamiento y enfriamiento posterior) y se ligan usando DNA ligasa de T4. A continuación, el producto de reacción se corta con las endonucleasas de restricción preferidas (*Xba* I y *EcoR* I) y se clona en el vector pMG402 (véase posteriormente).

Como alternativa, el fragmento de *gac* que contiene promotor, RBS y secuencia de señal puede amplificarse a partir de un plásmido que comprende elementos tales como el plásmido pKS55, cuya construcción se describe en la patente de la República Checa Nº 278.515. El gen gac clonado allí se ha derivado de una cepa de *Pseudomonas diminuta* (CCM 3987). La amplificación se lleva a cabo usando un sistema de PCR de alta velocidad. Los sitios de endonucleasas de restricción necesarios para la clonación se introducen a través de los siguientes cebadores de PCR.

Cebadores:

1. 5'-Fosfato - GGGGGGTCTAGACCAACAACATCTTCAACGTCTACC -3' (SEQ ID NO 6)

2. 5'-Fosfato - CC CCC CGA ATT CAC TAG TAC GCG TCT CTC TCC -3' (SEQ ID NO 7)

No habrá diferencia en el comportamiento entre un fragmento de *gac* generado a través de amplificación por PCR de alta fidelidad y un fragmento de *gac* generado mediante síntesis química.

El fragmento de *gac* así creado tiene la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 8):

5'-GGGGGGTCTAGACCAACAACATCTTCAACGTCTACCCGACCAAGATTCAGGAGCCGTCGG
CCGACCTGGGCAATGGGATGTACAGCGGGCTTGCGCCGTTCGGCTTCACCGGCGGATCCT
GGTTCGTACGCGCCGCCTACAAGTGGTGATCTAGGGGAACGTTCCGGGGGCGTCGCTGCA
ACGGCGTCTCCGGATCTGGGTGAGAGGGGAAATCCATGCTGAGAGTTCTGCACCGGGCGG
CGTCCGCCTTGGTTATGGCGACTGTGATCGGCCTTGCGCCCGCGGAGAGAGACGCGTACT
AGTGAATTCGGGGGG-3'

El fragmento de *gac* (bien sintético o bien creado a través de PCR) y el plásmido vectorial pMG402 se ligan usando los sitios *Xba* I y *EcoR* I. De este modo se genera el vector de expresión pMG412.

El vector de expresión, pMG412, contiene los codones 1 - 23 + el primer nucleótido del codón 24 de la secuencia de señal de gac. En los codones 22-24 se introduce el sitio Sac II mediante mutación silenciosa. Cualquier cosa aguas abajo del sitio Sac II en pMG412 es secuencia del cebador o el vector.

Los dos últimos nt del codón 24 + los codones 25-27 se introducen mediante el cebador de PCR directo para el gen estructural diana (rhIFNα2B, véase anteriormente). Por lo tanto, tal cebador contiene los siguientes elementos:

Saliente de corte (p. ej. 6 nucleótidos) - sitio Sac II - tc gcc ttt gcg (SEQ ID NO 9) - región hibridante correspondiente al extremo 5' del gen diana "maduro".

En particular, un cebador adecuado tiene la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 10):

TT GCG CCC GCG GTC GCC TTT GCG - región hibridante (Sac II subrayado)

Los últimos aminoácidos (24-27) de la secuencia de señal de gac son V A F A (SEQ ID NO 11).

A partir del constructo plasmídico descrito anteriormente, el gen rhIFNα2b se amplifica usando un sistema de PCR de alta fidelidad. El cebador de PCR 5' contiene el sitio Sac II para fusionar el gen con el fragmento de *gac* más los últimos cuatro codones de la secuencia de señal de gac. El cebador 3' contiene el codón de parada TAA (ocre) y el sitio *Mlu* I para la clonación. La amplificación del gen estructural de interferón α genera el siguiente fragmento (SEQ ID NO 12):

GGGGGGCCGCGGTCGCCTTTGCGTGCGATCTGCCGCAAACCCACAGCCTGGGTAGCCGGC
GAACCTTGATGCTTCTGGCACAGATGCGGCGAATCTCTCTTTTCTCTTGCTTAAAGGATC
GACATGACTTCGGTTTCCCGCAGGAGGAGTTCGGTAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCA
TCCCGGTATTGCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCTGTTCAGCACTAAGGACTCTT
CTGCTGCTTGGGATGAGACCCTGCTTGACAAATTCTACACTGAACTGTACCAGCAGCTGA
ACGACCTGGAAGCCTGCGTGATCCAGGGTGTGGGTGTGACTGAGACTCCGCTGATGAAGG
AGGACTCTATTCTGGCTGTGCGAAAATACTTCCAACGGATCACTCTGTATCTGAAAGAGA
AGAAATACAGCCCGTGCGCCTGGGAGGTTGTCCGAGCAGAAATCATGCGGTCTTTCTCTT
TGTCTACCAACTTGCAAGAATCTTTACGAAGCAAGGAATAATACGCGTGAATTCGGGGGG

Este fragmento de PCR de rhIFNα2b y pMG412 se ligan usando los sitios *Sac* II y *Mlu* I. De este modo, se generaba el plásmido de producción/expresión final pMG414. Ambas hebras de pMG414 se someten a secuenciación y no muestran diferencias con la secuencia esperada.

Características del plásmido pMG414 (tamaño total 3668 pb):

pb 2728-256: esqueleto de pUC19, parte 1

pb 257-546: fragmento de *gac* (promotor, RBS, secuencia de señal)

pb 547-1044: gen de rhIFNα2b sintético (incluyendo la parada TAA)

pb 1045-1454: sitios de clonación + esqueleto de pUC19, parte 2

pb 1455-2727: gen de *tet* procedente de pBR322 (promotor/RBS 1455-1536, secuencia codificante incluyendo la parada TAA 1537-2727)

De ese modo, el fragmento de *gac* que contiene promotor, RBS y secuencia de señal se fusiona al gen estructural rhIFNα2b - usando un sitio de endonucleasa de restricción en el extremo 3' del fragmento de gac introducido mediante un cebador de PCR. El mismo sitio se fusiona al extremo 5' del gen estructural rhIFNα2b, también por medio de un cebador de PCR. Así, después de clonar ambos elementos (fragmento de *gac* y gen estructural rhIFNα2b) en el vector básico, se genera un gen que codifica una proteína de fusión gac1ss-rhIFNα2b. De sus 192 codones totales (576 nucleótidos), los 27 primeros codifican la secuencia de señal de gac no presente en la proteína final y los aminoácidos 28 a 192 codifican rhIFNα2b maduro (165 aminoácidos, cisteína 1 hasta ácido glutámico 165).

La secuencia de nucleótidos del casete de expresión usado en el plásmido de expresión de rhIFNα2b pMG414 (807 pb) (véase posteriormente) y la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión gac1ss-rhIFNα2b se muestran como sigue (SEQ ID NO 13):

5'-TCTAGACCAACAACATCTTCAACGTCTACCCGACCAAGATTCAGGAGCCGTCGGCCGACC
TGGGCAATGGGATGTACAGCGGGCTTGCGCCGTTCGGCTTCACCGGCGGATCCTGGTTCG
TACGCGCCGCCTACAAGTGGTGATCTAGGGGAACGTTCCGGGGGCGTCGCTGCAACGGCG
TCTCCGGATCTGGGTGAGAGGGGAAATCC

**ATG** CTG AGA GTT CTG CAC CGG GCG GCG TCC GCC TTG GTT ATG GCG
M L R V L H R A A S A L V M A

ACT GTG ATC GGC CTT GCG CCC GCG GTC GCC TTT GCG
T V I G L A P A V A F A

TGC GAT CTG CCG CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC CGG CGA ACC TTG
C D L P Q T H S L G S R R T L

ATG CTT CTG GCA CAG ATG CGG CGA ATC TCT CTT TTC TCT TGC TTA
M L L A Q M R R I S L F S C L

AAG GAT CGA CAT GAC TTC GGT TTC CCG CAG GAG GAG TTC GGT AAC
K D R H D F G F P Q E E F G N

CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCG GTA TTG CAT GAG ATG ATC
Q F Q K A E T I P V L H E M I

CAG CAG ATC TTC AAC CTG TTC AGC ACT AAG GAC TCT TCT GCT GCT
Q Q I F N L F S T K D S S A A

TGG GAT GAG ACC CTG CTT GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTG TAC CAG
W D E T L L D K F Y T E L Y Q

CAG CTG AAC GAC CTG GAA GCC TGC GTG ATC CAG GGT GTG GGT GTG
Q L N D L E A C V I Q G V G V

ACT GAG ACT CCG CTG ATG AAG GAG GAC TCT ATT CTG GCT GTG CGA
T E T P L M K E D S I L A V R
AAA TAC TTC CAA CGG ATC ACT CTG TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC
K Y F Q R I T L Y L K E K K Y

AGC CCG TGC GCC TGG GAG GTT GTC CGA GCA GAA ATC ATG CGG TCT
S P C A W E V V R A E I M R S

TTC TCT TTG TCT ACC AAC TTG CAA GAA TCT TTA CGA AGC AAG GAA
F S L S T N L Q E S L R S K E

**TAA**

TACGCGTACTAGTGAATTC-3'

La secuencia que se muestra está dividida en subpárrafos / regiones que comprenden:

1. el promotor y el RBS de *gac* (primer párrafo, pb 257 a 465 de pMG414, véase posteriormente),

2. la región codificante de la secuencia de señal de *gac* (segundo párrafo, pb 466 a 546 de pMG414, véase posteriormente),

3. el gen sintético para rhIFNα2b (tercer párrafo, pb 547 a 1044 de pMG414 (véase posteriormente) - incluyendo el codón de parada TAA), y

4. el conector de clonación 3' (cuarto párrafo, pb 1045 a 1063 de pMG414, véase posteriormente).

En el pMG414 estas cuatro regiones están enlazadas directamente entre sí. Están separadas en la figura solo por razones de claridad.

Los codones de inicio (ATG) y parada (TAA) del marco de lectura abierto se muestran en negrita.

El codón primero (TGC) y el último (GAA) de rhIFNα2b maduro están subrayados.

Los sitios de endonucleasas de restricción usados para la clonación están recuadrados. Esto son:

- *Xba* I (TCTAGA) y *EcoR* I (GAATTC) para la introducción del fragmento de *gac* (promotor, RBS, secuencia de señal, sitios *Sac* II, *Mlu* I, *Spe* I)

- *Sac* II (CCGCGG) y *Mlu* I (ACGCGT) para la introducción del fragmento de PCR rhIFNα2b (incluyendo cuatro codones para los últimos cuatro aminoácidos del gac1ss, el gen sintético de 495 bp para rhIFNα2b maduro, y el codón de parada TAA(T)).

El promotor de gac muestra gran actividad constitutiva / basal, no se requiere la adición de un inductor químico o un estímulo físico (cambio en las condiciones de cultivo).

1.3 Clonación y establecimiento de la línea celular recombinante

El plásmido de expresión pMG414 se introduce en la cepa huésped ATCC PTA-3132 (=W3110 (ATCC 27325)) mediante electroporación. Se preparan células electrocompetentes según un protocolo estándar, la electroporación se lleva a cabo en cubetas de 0,1 mm a 1800 V usando un Eppendorf Electroporator 2510.

Después de la electroporación, la reacción se suspende en medio líquido y se cultiva en placa sobre placas de agar que contienen tetraciclina.

El punto de partida para la selección de un clon celular adecuado es una placa de transformación así obtenida. Diversos clones procedentes de esta placa se hacen crecer en cultivo líquido y se crioconservan como bancos celulares de investigación. Su productividad se prueba en experimentos de matraz agitado y se compara. El mejor clon (E1/116) se usa para el desarrollo adicional.

El mejor clon puede mostrar buena productividad pero un desarrollo relativamente pobre. Este desarrollo pobre puede resultar de diversos factores, p. ej. toxicidad del producto para la célula huésped, carga metabólica debido a la síntesis del producto, etc. La adición de glucosa a menudo conlleva alguna mejora debido a que la glucosa regula a la baja (p. ej. mediante represión de catabolitos) muchos promotores usados para la expresión de proteínas recombinantes. Además, la glucosa tiene un efecto positivo general sobre el desarrollo de *E. coli* debido a que puede introducirse directamente en el metabolismo como una fuente de carbono.

En el caso de E1/116, se observa un claro efecto positivo de la glucosa sobre el desarrollo. Los mejores resultados se alcanzan con concentraciones de glucosa entre 2 y 5 g/l. Para adaptar la línea celular para hacer frente a la formación de producto y por consiguiente para un mejor desarrollo en ausencia de glucosa, la cepa se desarrolla por lo tanto en medio líquido en matraces agitados durante varios pases ("cascada de matraces agitados").

Más específicamente, un criovial de E1/116 se descongela y la suspensión celular se cultiva en estrías sobre placas de agar LB libres de glucosa que contienen tetraciclina. La placa se incuba a 37°C hasta que las colonias alcanzan un tamaño suficiente para inocular un cultivo líquido. Las colonias se transfieren desde la placa a matraces agitados pequeños cargados con 15 ml de caldo LB libre de glucosa que contiene tetraciclina. Los cultivos se agitan a 37°C hasta que alcanzan una densidad óptica a 600 nm de más de 0,5 (típicamente > 1,0). Para esta primera ronda esto lleva hasta 48 horas debido a las pobres características de desarrollo del aislado original.

El procedimiento descrito en el párrafo anterior se realiza cinco veces consecutivas, cultivándose en estrías sobre placas el cultivo líquido de la ronda previa y sirviendo las colonias procedentes de la placas para inocular el siguiente cultivo líquido. A partir de cada cultivo líquido se determina la densidad óptica y se tomaba una muestra para la determinación del título del producto usando SDS-PAGE - transferencia Western. A continuación, se usan clones procedentes del cultivo con la mejor combinación de desarrollo y productividad para iniciar la siguiente ronda.

En el curso de las diferentes rondas de esta cascada de cultivo (es decir, múltiples etapas de propagación y reaislamiento) las características de desarrollo de la(s) (sub)cepa(s) se mejoran gradualmente. Eligiendo la cepa con la mejor combinación de desarrollo y productividad en cada ronda, los títulos también se incrementan gradualmente. Después de la quinta ronda, de nuevo se generan colonias simples sobre placas de agar LB que contienen tetraciclina y se usan para inocular un cultivo líquido que contiene tetraciclina para la generación de un lote de siembra primario (PSL). El cultivo se desarrolla a 37°C hasta una densidad óptica de aproximadamente 1,5, se mezcla con una cantidad igual de glicerol estéril al 40% p/v, se divide en partes alícuotas en viales criogénicos y se congela a -80°C. Este PSL se usa como un punto de partida para la generación de los bancos de células del GMP (Master Cell Bank y Working Cell Bank) de la cepa de producción de interferón α2b. Este reaislado se denomina E1/116a. Procedimientos de reaislamiento como el descrito anteriormente han demostrado dar resultados reproducibles.

E1/116a muestra excelentes características de desarrollo en matraces agitados y biorreactores removidos (fermentadores). Un inóculo adecuado para iniciar un biorreactor puede desarrollarse en un matraz agitado partiendo de un vial del Working Cell Bank en aproximadamente 8 horas.

Se prepara un Master Cell Bank bajo condiciones de cGMP a partir del lote de siembra primario descrito anteriormente. En resumen, un vial de PSL se descongela y se cultiva en placa sobre placas de agar que contienen tetraciclina. Una colonia individual se recoge y se usa para inocular el cultivo en matraz agitado de Master Cell Bank (MCB) (medio de caldo LB que contiene tetraciclina). La suspensión celular procedente de la fase de desarrollo logarítmico se mezcla 1+1 con glicerol al 40 % p/v, se divide en partes alícuotas en 1,8 ml en viales criogénicos, se sella en un tubo criogénico y se congela en la fase líquida de un depósito de nitrógeno líquido.

El Working Cell Bank se genera del mismo modo que el Master Cell Bank, excepto que el cultivo en matraz agitado se inocula con una suspensión celular procedente de un vial de MCB descongelado.

**Ejemplo 2: Procedimiento de fermentación para la producción de interferón α2B humano recombinante (rhIFNα2B)**

El procedimiento de fermentación se inicia desarrollando la cepa E. coli K-12 W3110 obtenible del Working Cell Bank según se describe anteriormente en cultivos en matraz agitado en medio de Luria Bertani (LB) a 37°C con la adición del antibiótico hidrocloruro de tetraciclina para evitar el desarrollo de células que no portan plásmido.

El cultivo en matraz agitado se usa a continuación para inocular el medio de cultivo seminal (= precultivo) (tamaño del inóculo = 0,4%). El medio para este precultivo se basa en agua desionizada que contiene glucosa como única fuente de carbono y autolisado de levadura como una fuente de nitrógeno compleja. Además, se añaden al medio sales inorgánicas como $KH_2PO_4$, $K_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ y $MgSO_4.7H_2O$. Como un agente antiespumante se usa polipropilenglicol 2000 (PPG2000). En particular, el medio de precultivo tiene la siguiente composición:

Medio Basal de Precultivo:

| **Componente** | **Cantidad** |
|---|---|
| Agua desionizada (WBI) | 30 l |
| Autolisado de levadura, KAT, Ohly | 21,7 g/l |
| Monohidrato de glucosa, puro | 25,0 g/l |
| Sulfato amónico, p.a. | 1,0 g/l |
| Fosfato potásico monobásico, p.a | 1,5 g/l |
| Fosfato potásico dibásico, anhidro, puro | 3,0 g/l |

(continuación)

| Componente | Cantidad |
|---|---|
| Heptahidrato de sulfato magnésico, p.a. | 0,5 g/l |
| Polipropilenglicol 2000 | 0,5 ml/l |

Estos medios se esterilizan juntos durante 20 minutos a 121°C. Después del enfriamiento del medio basal, una parte alícuota de una solución madre estéril de 5 g/l del antibiótico hidrocloruro de tetraciclina se añade al medio basal (la esterilización se realiza mediante filtración (filtro de 0,22 µm)).

Solución madre de hidrocloruro de tetraciclina (5 g/l):

| Componente | Cantidad |
|---|---|
| Hidrocloruro de tetraciclina crist., Far. Eur. | 15 mg/l |
| Agua desionizada (WBI) | |

El tiempo de cultivo para el cultivo seminal es de aproximadamente 16 horas. Durante el cultivo seminal el valor del pH se controla hasta un punto fijo de 7,0 ± 0,2 con ácido sulfúrico e hidróxido sódico o solución concentrada de amoníaco. La concentración de oxígeno disuelto se mantiene a niveles superiores al 20% de saturación incrementando la velocidad del removedor. La velocidad del removedor al principio del cultivo se fija hasta 300 rpm, la contrapresión en el recipiente hasta 0,3 bar y la velocidad de aireación se controla hasta 30 l/min (equivalentes a "1 vvm"). La temperatura se mantiene constantemente a 37°C durante el cultivo. Como un criterio de transferencia de caldo a la fase principal del procedimiento de fermentación, se usa un incremento de la concentración de oxígeno disuelto después del consumo de la fuente de carbono.

Para el cultivo del cultivo principal, se usa un medio basado en agua desionizada, glucosa como una fuente de carbono y autolisado de levadura como una fuente de nitrógeno compleja. Además de la adición de las sales inorgánicas $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2.2H_2O$ y $MgSO_4.7H_2O$, se usa PPG 2000 como un agente antiespumante. La glucosa inicial se esteriliza separadamente y se añade al resto estéril del medio. El tamaño del inóculo al medio principal del fermentador estaba en un intervalo entre 0,75 y 3%. En particular, el medio de cultivo principal tiene la siguiente composición:

Medio Basal de Cultivo Principal:

| Componente | Cantidad |
|---|---|
| Agua desionizada (WBI) | 60 l |
| Autolisado de levadura, KAT, Ohly | 43,5 g/l |
| Sulfato amónico, p.a. | 1,0 g/l |
| Dihidrato de cloruro cálcico crist., p.a. | 0,3 g/l |
| Heptahidrato de sulfato magnésico, p.a. | 1,0 g/l |
| Polipropilenglicol 2000 | 0,5 ml/l |

Estos componentes del medio se esterilizan juntos durante 20 minutos a 121°C. Después del enfriamiento, una parte alícuota de una solución madre de glucosa termoestabilizada separadamente de 800 g/l se añade al medio basal de cultivo principal (la esterilización se realiza durante más de 30 minutos a 120°C).

Solución madre de glucosa, 800 g/l:

| Componente | Cantidad |
|---|---|
| Jarabe de glucosa | 12,5 ml/l |
| Agua desionizada (WBI) | |

El punto más importante durante este cultivo es la necesidad de un consumo completo de la glucosa inicial presente en el medio. Esto conduce a un incremento brusco de la concentración de oxígeno disuelto después de aproximadamente 9 horas de desarrollo. Comenzando la alimentación de glucosa antes del consumo total de la glucosa inicial, no se observaba formación de producto. Por lo tanto, la limitación de glucosa controlada por la alimentación de la solución de glucosa a una velocidad constante es muy importante. La temperatura durante el cultivo se controla hasta un valor constante de aproximadamente 28°C. La velocidad inicial del removedor se fija hasta 300 rpm, la velocidad de aireación se controla hasta 100 l/min (equivalente a "1 vvm") y la contrapresión en el recipiente se fija hasta 0,3 bar. El valor del pH se controla hasta 7,1 ± 0,3 con ácido sulfúrico e hidróxido sódico o solución concentrada de amoníaco. Es aceptable un máximo del valor de pH de hasta 8,0 después del consumo de la glucosa inicialmente suministrada.

La concentración del oxígeno disuelto se controla hasta valores superiores al 20% de saturación. Dependiendo de la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor, la concentración de OD se mantiene a niveles superiores que el 20% de saturación, preferiblemente entre aproximadamente 40% y 100% de saturación, incrementando en primer lugar la velocidad del removedor hasta un valor máximo. Si esto no es suficiente, se incrementa en primer lugar la velocidad de aireación y después la contrapresión, respectivamente. Después de un tiempo de cultivo de entre 48 y 192 horas (se observa un incremento lineal de formación de producto con el tiempo de cultivo) el cultivo se recoge y se enfría hasta 15 ± 5 °C y se acondiciona para el procesamiento aguas abajo mediante la adición de sacarosa/EDTA al caldo enfriado.

Los resultados de una partida de fermentación se analizan basándose en la técnica de transferencia Western o en medidas de HPLC después de la extracción periplásmica en laboratorio o en planta piloto del producto.

**Ejemplo 3: Ruptura y extracción celular**

Un caldo de fermentación que contiene células huésped que comprenden el interferón α2B expresado en el espacio periplásmico se ajusta con ácido sulfúrico hasta un pH de 5,0 ± 0,1 inmediatamente después de la fermentación y se enfría hasta 4°C ± 2°C. El pH bajo y la temperatura baja ayudan a desactivar proteasas endógenas.

El caldo de fermentación se ajusta hasta de 10°C a 20°C, a continuación, sin concentración o lavado de las células, se añaden sacarosa sólida o líquida (200 g de sacarosa/kg de caldo de fermentación) y EDTA (concentración 10 mM) y el pH se ajusta hasta 8,0. Después de un protocolo de penetración celular de una sola etapa selectivo usando choque osmótico (1+3 diluciones) con agua enfriada, con lo que el caldo de fermentación que comprende sacarosa y EDTA se vierte o se bombea en el agua enfriada (temperatura aproximadamente 4°C), el extracto periplásmico liberado se clarifica. Se añade polietilenimina hasta una concentración final de 0,05% y el pH se ajusta hasta aproximadamente 7,5 con ácido acético. Después de 15 a 45 minutos el residuo celular y el DNA floculan, dejando un extracto bruto transparente que contiene interferón que puede someterse a centrifugación para mejorar la transparencia.

Este procedimiento conduce a un extracto periplásmico transparente que comprende el interferón α2B deseado con alto rendimiento con una pureza de > 20% con respecto al contenido de proteína total. La polietilenimina ayuda a separar el residuo celular del extracto proteínico soluble conduciendo a una solución de interferón muy pura.

**Ejemplo 4: Purificación cromatográfica de interferón α2B (rhIFNα2B) humano recombinante**

4.1 Captura mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

Después del ajuste del pH hasta 4,8 - 5,2 con ácido acético y una etapa de filtración usando un filtro de 0,3 micras, el extracto bruto del Ejemplo 3 se aplica a la columna de CEX (S ceramic HyperD F (Biosepra)). Después de una etapa de lavado con un tampón de equilibrado (acetato sódico 20 mM y NaCl 70 mM a pH 5,0) el interferón se eluye con un gradiente por etapas con NaCl 175 mM. La fracción recogida se procesa inmediatamente mediante la etapa de procesamiento del Ejemplo 4.2.

4.2 Cromatografía de intercambio aniónico (AEX)

La fracción procedente del Ejemplo 4.1 se ajusta hasta un pH de 7,3 a 7,7 con hidróxido sódico, se diluye y se purifica con agua hasta una conductividad de 3,5 a 4,5 mS/cm y se aplica a la columna de AEX (Q ceramic HyperD F (Biosepra)). Después del lavado, el interferón se eluye con un gradiente salino lineal (NaCl 0-300 mM) con NaCl aproximadamente 150 mM. Se recogen las fracciones que tienen una pureza de más de o igual a 90% del área según la HPLC en fase inversa IPC y se usan directamente en la siguiente etapa (véase el Ejemplo 4.3).

4.3 Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

La fracción del Ejemplo 4.2 se diluye (1:1) con una solución madre de sulfato sódico (sulfato sódico al 0,5%), se ajusta hasta pH 7,3 a 7,7 con NaOH o HCl y se aplica a la columna de HIC (Source 15PHE (Pharmacia)). Después del lavado, la fracción de interferón del Ejemplo 3 se eluye con una concentración de sulfato sódico lineal (sulfato sódico 800 - 0 mM) con sulfato sódico aproximadamente 400 mM. Las fracciones recogidas que tienen una pureza de más de o igual a 93% del área y ninguna impureza mayor que o igual a 3% según HPLC en fase inversa IPC se usan directamente en la siguiente etapa de purificación.

4.4 Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

Las fracciones recogidas del Ejemplo 4 se diluyen con agua hasta una conductividad final de 7,5 a 8,5 mS/cm, se ajustan hasta pH 4,3 a 4,7 con ácido acético al 99 a 100% y se aplican a la columna de CEX (Toyopearl SP-650 S (TosoHaas)). Después de una etapa de lavado, el interferón se eluye en un gradiente lineal de NaCl (NaCl 0 - 300 mM) con NaCl aproximadamente 250 mM. Se recogen las fracciones que tienen una pureza de más de o igual a 95% del área y ninguna impureza mayor que o igual a 3% según una HPLC en fase inversa IPC y se usan directamente en la siguiente etapa de purificación.

4.5 Cromatografía de exclusión por tamaño

La última etapa de purificación es una etapa de filtración en gel para retirar dímeros y otros agregados y para realizar un intercambio de tampón para la formulación final. El Superdex 75 pg usado en esta etapa muestra una buena resolución incluso con un alto volumen de carga (5% - 15%). La SEC se realiza en fosfato sódico 25 mM y NaCl 130 mM + EDTA 0,3 mM a un pH de aproximadamente 7,3 a 7,7.

Las fracciones con la pureza más alta (> 95% del pico principal en RP-HPLC y sin pico secundario > 3 %) se reúnen para dar una solución a granel final que comprende el interferón α2B humano recombinante deseado en forma pura con un alto rendimiento.

Deposición de microorganismos:

La cepa de E. coli W3110 (ATCC 27325), que se usa en la presente memoria, se ha depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE. UU. de A. el 28 de febrero de 2001, bajo la denominación Nº PTA-3132.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la preparación de un polipéptido recombinante de interés, que comprende

(i) fermentación de una célula huésped procariótica que comprende un periplasma y que está transformada con un sistema de expresión recombinante capaz de producir la secreción de un polipéptido de interés en el periplasma de dicha célula huésped, donde dicha fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el polipéptido de interés se secrete al periplasma de la célula huésped, y

(ii) extracción del polipéptido de interés del periplasma aplicando un choque osmótico a las células huésped contenidas en el medio de fermentación,

en el que dicho choque osmótico se realiza mediante la adición de sacarosa directamente al medio de fermentación y la posterior dilución con $H_2O$ de modo que la membrana celular externa de la célula huésped se rompa suficientemente para liberar el contenido de su periplasma en el medio de fermentación.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de la sacarosa en el medio de fermentación cuando comienza la dilución es aproximadamente 20% en peso/volumen.

3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el factor de dilución del caldo de fermentación que contiene sacarosa con $H_2O$ es al menos 3 veces.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha célula huésped procariótica es una bacteria gramnegativa.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha bacteria gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en Escherichia coli, una especie de Pseudomonas, una especie de Enterobacter, una especie de Campylobacter y una especie de Vitreoscilla.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que la bacteria gramnegativa es E. coli.

7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un interferón, una interleucina, una hormona del crecimiento, un factor de crecimiento, una citocina, una enzima, un inhibidor de enzima, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo.

8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de interés es un interferón α2.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el interferón α2 se selecciona del grupo que consiste en interferón α2A e interferón α2B.