

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 068**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 06785535 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1907561**

54 Título: **Líneas celulares para expresar enzima útil en la preparación de productos amidados**

30 Prioridad:

24.06.2005 US 693612 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.01.2014

73 Titular/es:

**ENTERIS BIOPHARMA, INC. (100.0%)
83 Fulton Street
Boonton, NJ 07005, US**

72 Inventor/es:

**MILLER, DUNCAN A.;
MEHTA, NOZER M. y
CONSALVO, ANGELO P.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 437 068 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

Líneas celulares para expresar enzima útil en la preparación de productos amidados

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a líneas celulares, para la expresión de monooxigenasa peptidilglicina alfa amidante (PAM o α -AE).

10 PAM (o uno de sus dominios catalíticos) es útil para catalizar la conversión enzimática de X-Gly a X-alfa-hidroxi-Gly o X-NH₂ (siendo X un péptido o cualquier compuesto químico que tenga un grupo carbonilo al que pueda unirse covalentemente un grupo de glicina).

Descripción de la técnica relacionada

15 Numerosas hormonas humanas, factores de crecimiento, citocinas, neurotransmisores, ácidos grasos derivados y otros compuestos biológicos importantes tienen aminoácido o péptido como una parte sustancial de sus estructuras moleculares. Muchas enfermedades responden positivamente a la elevación del nivel de estos compuestos biológicos en los pacientes. Pueden administrarse cantidades terapéuticamente eficaces de dichos compuestos biológicamente relevantes a pacientes de diversas maneras. Por lo tanto son muy importantes los procedimientos de fabricación rentables eficaces para dichos compuestos. Esto es especialmente cierto cuando los compuestos biológicos se preparan en forma de dosificación para suministro oral, un modo habitualmente preferido de administración a pesar de la menor biodisponibilidad en relación con otros modos de administración.

25 Las células de mamífero y otras eucariotas pueden realizar ciertos procedimientos de procesamiento post-traduccionales, mientras que las procariotas no. Ciertas procariotas, tales como *E. coli*, se emplean ampliamente como hospedadores para la producción de proteínas de mamífero mediante tecnología de ADN recombinante (ADNr) debido a que pueden cultivarse fácilmente en procedimientos de fermentación discontinua y debido a que están bien caracterizados genéticamente. Sin embargo, muchas proteínas de mamífero requieren algún tipo de procesamiento post-traduccionales. Si estas proteínas se producen por ingeniería genética de *E. coli*, por ejemplo, el procesamiento post-traduccionales debe conseguirse con frecuencia usando procedimientos químicos *in vitro* complejos que son caros para aplicaciones de producción a gran escala. Incluso cuando los péptidos se producen de forma recombinante usando huéspedes mamíferos, es con frecuencia deseable producir eficazmente un precursor que se someta solamente después a modificación adicional.

35 Un tipo de dicha actividad de procesamiento adicional implica la amidación específica del aminoácido carboxilo terminal de un péptido o proteína. Muchas hormonas y péptidos de origen natural contienen dicha modificación, que con frecuencia es esencial si la proteína va a ser biológicamente activa. Un ejemplo es calcitonina, en la que la sustitución con un resto de prolina no amidado de la prolina amidada de la forma nativa da como resultado una reducción muy significativa de la actividad biológica. Otros péptidos biológicos que requieren amidación post-traduccionales para su actividad completa incluyen pero sin limitación factor de liberación de la hormona del crecimiento, otras calcitoninas, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, secretina, péptido YY y similares.

45 Las secuencias polipeptídicas para muchas proteínas biológicas importantes que requieren amidación para máxima eficacia, pueden fabricarse, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, la importante, y en ocasiones esencial, amidación carboxilo terminal debe realizarse con frecuencia *in vitro*. Es deseable evitar técnicas de amidación química costosas e incómodas en este punto, y es por lo tanto deseable utilizar una enzima amidante para realizar la amidación específica. La amidación específica del aminoácido carboxilo terminal de una proteína se cataliza frecuentemente por enzimas alfa-amidantes.

50 La monooxigenasa peptidilglicina α amidante (PAM) cataliza la conversión de un sustrato peptídico a un producto peptídico amidado. La conversión es una reacción de dos etapas. PAM tiene dos dominios catalíticos: monooxigenasa peptidilglicina α amidante (PHM) cataliza la etapa 1 (conversión de sustrato a intermedio) y liasa peptidilglicina α -hidroxiglicina α -amidante (PAL) cataliza la etapa 2 (conversión de intermedio a producto). La PAM de longitud completa es bifuncional y cataliza más etapas. La etapa 2 también puede conseguirse eficazmente de forma no enzimática si el intermedio se pone en contacto con una base de Lewis.

60 En la naturaleza, aproximadamente el 50 % de las hormonas peptídicas y neurotransmisores están amidados por PAM de la manera anterior. La actividad PAM se ha reconocido en numerosas especies diversas, PAM tiende a tener homología estructural significativa entre especies tan diversas como rata, vaca y rana. También se sabe que la función, sustrato y cofactores de PAM son similares (frecuentemente idénticos) entre especies. El sustrato es un compuesto, con frecuencia un péptido, que tiene un resto de glicina con un grupo carboxilo libre. Se conocen bien en la técnica reacciones de amidación catalizadas por PAM. Por ejemplo, se describe una en detalle en la Patente de Estados Unidos 6.103.495 en la que se usa una monooxigenasa peptidilglicina α amidante para catalizar la conversión de un precursor de calcitonina de salmón extendido con glicina a calcitonina de salmón auténtica,

65

amidada en su extremo C terminal (es decir, que tiene un grupo amino en lugar de la glicina C terminal del precursor).

5 Se conocen en la técnica fuentes de PAM y líneas celulares que expresan PAM. La producción catalizada por PAM a gran escala de péptidos amidados requiere una fuente de alto rendimiento estable de PAM para mejor rentabilidad. Adicionalmente, debido a que PAM se utiliza frecuentemente para la producción de productos farmacéuticos humanos potenciales, es importante que el sistema para la producción de PAM (tanto la línea celular que expresa PAM como el medio de cultivo en el que crece) introduzca tan pocas impurezas como sea posible durante la expresión de PAM. Es de interés particular minimizar el uso de las proteínas de mamífero para evitar el riesgo de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE). Los factores de crecimiento proteicos de mamíferos en el medio de cultivo (no deseable desde un punto de vista de TSE) pueden no obstante ser útiles para ayudar a la supervivencia y expresión de producto de líneas celulares que expresan PAM. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de células que expresen PAM (o que expresen PHM) que proporcionen fuerte expresión y muestren buena estabilidad y supervivencia incluso en ausencia de proteínas de mamífero que podrían de otro modo requerirse en el medio.

Sumario de la invención

20 Es por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar células que expresen PAM que sean suficientemente resistentes para tener buenas tasas de supervivencia y buenos rendimientos de expresión en medio sustancialmente desprovisto de los tipos de proteínas de mamífero y otras impurezas que podrían ser problemáticas cuando la enzima se use posteriormente en la fabricación de productos (por ejemplo fabricación de productos farmacéuticos amidados).

25 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar células que expresen PAM que no co-expresen en sí mismas impurezas indeseables significativas.

30 Es un objetivo adicional proporcionar células que expresen PAM que proporcionen buenos rendimientos de expresión.

Es un objetivo adicional proporcionar un método para purificar PAM o PHM para su uso en reacciones enzimáticas, y para proporcionar de este modo buenas reacciones enzimáticas y producto amidado resultante.

35 Estos y otros objetivos los proporcionan las invenciones desveladas en la presente memoria.

La invención proporciona una línea celular que tiene el N° de designación de depósito de ATCC PTA-6784 (UGL 73-26/M).

40 La invención proporciona el uso de una línea celular que tiene el N° de designación de depósito de ATCC PTA-6784 para expresar monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante.

45 La invención proporciona un método para la producción *in vitro* de un producto amidado, comprendiendo dicho método usar la línea celular con el N° de designación de depósito de ATCC PTA-6784 para expresar monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante y hacer reaccionar un precursor que tenga un resto de glicina, en forma de ácido libre y unido a un grupo carbonilo, en presencia de la monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante.

50 La invención proporciona un método para purificar una seleccionada de monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante y monooxigenasa peptidilglicina alfa-hidroxilante después de la expresión y secreción de la misma al medio de cultivo, incluyendo dicho método las etapas de:

(A) someter una muestra impura de monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante o monooxigenasa peptidilglicina alfa-hidroxilante, respectivamente, a cromatografía de intercambio aniónico en la que la elución es isocrática;

(B) someter el eluyente de la etapa (A) a cromatografía de interacción hidrófoba, en la que no se usa sulfato de amonio y en la que la elución es isocrática.

55 En otra realización, en el método de purificación anterior, se utiliza citrato sódico para facilitar la unión a la columna en la etapa (B).

60 La enzima deseada se expresa por la línea celular de la invención, y en realizaciones preferidas se purifica de acuerdo con una técnica de purificación de la invención. Después se realizan reacciones en presencia de la enzima comenzando con precursores que tienen un resto de glicina, en forma de ácido libre y unido a un grupo carbonilo. Las condiciones de reacción y los co-factores se conocen en la técnica. Los Ejemplos 1 y 2, en la presente memoria, muestran una reacción de amidación típica y purificación de producto amidado. Se dan como resultado productos amidados preferidos. Cuando se utiliza monooxigenasa peptidil alfa-hidroxilante, se da como resultado un intermedio que requiere reacción adicional con una base de Lewis o liasa peptidil alfa-hidroxi glicina alfa-amidante para formar el producto amidado.

5 Cuando líneas celulares que producen enzima tales como las analizadas en la presente memoria expresan y secretan enzima al medio de cultivo, pueden seguirse una serie de etapas, en ciertas realizaciones, para purificar la enzima. Una etapa de recogida separa el medio acondicionado de las células. Una primera filtración de flujo tangencial (concentración, diafiltración) retira componentes de bajo peso molecular. Se utilizan una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba principalmente para purificación de impurezas proteicas y componentes del medio. Se emplea idealmente una filtración de flujo tangencial final, concentración e intercambio de tampón antes de la filtración del virus antes del almacenamiento. Se reivindica en la presente memoria cromatografía de intercambio aniónico mejorada y cromatografía de interacción hidrófoba.

15 Se ha descubierto sorprendentemente que pueden usarse células CHO K1 idealmente estables en el contexto de la invención a pesar de la presencia de un gen de dihidrofolato reductasa endógeno. El gen endógeno no interfiere significativamente con la selección de metotrexato basándose en un marcador seleccionable que tiene un gen de dihidrofolato reductasa.

20 Se cree que la co-transfección del gen de PAM con dos marcadores seleccionables en vectores independientes, como se describe en la presente memoria, aumenta significativamente las posibilidades de que se produzca co-amplificación en partes más deseables del genoma.

La monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante expresada y purificada de acuerdo con la presente invención está sustancialmente sin actividad proteasa indeseable y es adecuada para amidación alfa eficaz del sustrato como se describe en la presente memoria.

25 La línea celular analizada en la presente memoria ATCC PTA-6784, (UGL 73-26/M), mostró un buen perfil de longevidad, y se cree por lo tanto que es particularmente útil para aumento de escala cuando la estabilidad tiene importancia significativa.

30 De forma similar, las técnicas de purificación preferidas analizadas en la presente memoria proporcionan características escalables y pureza de producto significativa. Específicamente, se usa elución isocrática que simplifica significativamente la recogida de fracciones. El uso de la técnica anterior de sulfato de amonio en relación con cromatografía de interacción hidrófoba se evita idealmente debido a que el sulfato de amonio puede provocar precipitación e inactivación de la enzima.

35 Por analogía, se espera que las invenciones descritas en la presente memoria sean beneficiosas con respecto a monooxigenasa peptidilglicina alfa-hidroxilante, ya que han sido beneficiosas con monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante.

40 Cuando se usan (A) PHM y (B) PAL o una base de Lewis, para amidación en lugar de PAM, puede obtenerse la PHM y PAL (cuando se use) de varias maneras. Algunas se exponen a continuación.

PHM

45 *Expresar formas de origen natural del gen de PAM que cuando se expresa contiene solamente la actividad PHM*

Una enzima derivada de rana es una enzima PHM de origen natural, véase Mizuno *et al* (1986), "Peptide C-Terminal α -Amidating Enzyme Purified to Homogeneity From *Xenopus laevis* Skin" *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 137 (3) 984-991, que se descubrió después que era una PHM en lugar de PAM de longitud completa. Véase Suzuki *et al* (1990), *EMBO* 9 (13) 4259-4265.

50 *Expresar una PAM de longitud completa y escindir*

Podría usarse una proteasa específica para escindir la enzima de PAM en un sitio entre la actividad PHM y la actividad PAL, por ejemplo, un sitio de escisión dibásico. El dominio catalítico de PHM puede obtenerse después por purificación. Por ejemplo, Ouafik *et al*, (1992) *The Multifunctional Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase Gene: Exon/Intron Organization of Catalytic, Processing, and Routing Domains* *Molecular Endocrinology* 6 (10) 1571-1584 describe la localización de los dos dominios catalíticos en una PAM derivada de rata, y observa que "la escisión proteolítica en un sitio básico emparejado puede separar los dos dominios catalíticos". Véase también Eipper *et al* (1993), "Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase: A Multifunctional Protein With Catalytic, Processing, and Routing Domains" *Protein Science* 2, 489-497.

60 *Introducir un codón de parada en PAM o una mutación puntual que altere la fase de lectura*

Como alternativa, pueden introducirse codones de parada de la traducción (TAA, TAG, TGA) en cualquier ADNc de PAM de cualquier especie entre dos dominios funcionales de PAM (PHM y PAL), o podría introducirse una mutación puntual en dicha localización para alterar la fase de lectura.

Volver a modificar por ingeniería genética un vector de expresión solamente con un ADNc de PHM

5 Usando PCR, se pudo sintetizar un gen de PAM truncado que codificase solamente el dominio de PHM y ponerlo en un vector de expresión cadena abajo de una secuencia promotora o potenciadora/promotora.

Se exponen a continuación referencias adicionales para diferentes tipos de enzima PAM y sus dominios catalíticos:

10 Mizuno, K. *et al.*, (1987) "Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal α -amidating enzyme" from *Xenopus Laevis* *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 148 (2) 546-552.

Ohsuye, K., *et al.*, (1988) "Cloning of a cDNA encoding a new C-terminal α -amidating enzyme having a putative membrane-spanning domain" from *Xenopus Laevis* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150 (3) 1275-1281.

15 Koljekar, A.S., *et al.*, (1997) "Peptidylglycine α -amidating hydroxylating monooxygenase: active site residues, disulphide linkages and tow-domain model of the catalytic core", *Biochemistry* 36:13901-13909.

20 Koljekar, A.S., *et al.*, (2002) "Essential features of the catalytic core of Peptidylglycine α -hydroxyglycine α -amidating lyase", *Biochemistry*, 41:12384-12394.

Bertelsen, A.H., *et al.*, (1990) "Cloning and characterization of two alternatively spliced rat α -amidating enzyme cDNAs from rat medullary thyroid carcinoma", *Arch. Biochem. Biophys.*, 279 (1) 87-96.

25 Jimenez N., *et al.*, (2003) "Androgen-independent expression of adrenomedullin and peptidylglycine α -amidating monooxygenase in human prostatic carcinoma", *Molecular Carcinogenesis* 35: 14-24.

PAL

Expresar formas de origen natural de PAL

30 Los dos dominios catalíticos de PAM se codifican por genes separados en *Drosophila* y en nidarios (anémoma de mar). Por lo tanto, el gen que codifica PAL de estas especies puede expresarse cuando se pone en un vector de expresión cadena abajo de un promotor o secuencia potenciadora/promotora. Véase, Kolhekar, AS, *et al.* (1997) "Neuropeptide Amidation in *Drosophila*: Separate Genes Encode the Two Enzymes Catalyzing Amidation" *J. Neuroscience* 17(4):1363-1376

Expresar un PAM de longitud completa y escindir

40 Podría expresarse PAM bifuncional de longitud completa, y puede realizarse escisión en un sitio de proteasa específico entre los dominios de PHM y PAL y/o dentro del dominio de PHM para inactivar la PHM. Podría usarse cualquier proteasa específica de forma adecuada para disociar la actividad PHM de la actividad PAL, por ejemplo, un sitio de escisión dibásico. La actividad/proteína PAL puede purificarse adicionalmente. Se ha descrito un procedimiento similar y una localización para el sitio de escisión dibásico anteriormente en relación con la obtención de PHM.

Volver a modificar por ingeniería genética un vector de expresión solamente con un ADNc de PAL

50 Usando PCR podría sintetizarse un gen de PAM truncado que codifica solamente el dominio de PAL y ponerse en un vector de expresión cadena abajo de un promotor o secuencia potenciadora/promotora.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención que hace referencia a las figuras, diagramas, tablas adjuntas y similares.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es un mapa plasmídico de pHS1.

La Figura 2 es un mapa plasmídico de pUC8.

60 La Figura 3 es un mapa plasmídico de pSV402MT.

La Figura 4 es un derivado de la secuencia génica de ADNc de α -AE.

65 La Figura 5 es un mapa plasmídico de pAE73.

La Figura 6 es un esquema de adaptación de suspensión 73-26.

La Figura 7 es una concentración de oxígeno disuelto y productividad de α -AE en matraces de agitación.

La Figura 8 es un efecto del volumen de agitación en OD y productividad de α -AE.

La Figura 9 es un pH de cultivo de agitación de UGL 73-26/M.

La Figura 10 es un perfil de pH de biorreactores en tanque agitado y matraces de agitación sin control de pH.

La Figura 11 es un efecto del pH sobre la productividad de UGL 73-26/M α -AE en biorreactores de tanque agitado.

La Figura 12 es un SDS-PAGE de enzima PAM purificada.

La Figura 13 es una exploración densitométrica de gel de SDS-PAGE y cálculo de porcentaje de áreas de pico.

La Figura 14 es un diagrama de flujo del procedimiento para la producción de α -AE.

La Figura 15 es un esquema de inóculo para UGL 73-26/M.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

Se depositó una línea celular que expresaba PAM de acuerdo con la invención (designada de forma interna UGL 73-26/M MWCB 00) en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas Virginia, 20110-2209, Estados Unidos, en o aproximadamente el 10 de junio de 2005, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos para fines de Procedimiento de Patente. El número de referencia de ATCC es PTA 6784. Esta línea celular depositada está sujeta a las regulaciones promulgadas según este Tratado, y se pondrán a disposición muestras en el momento, y según las condiciones requeridas por el Tratado, y en cumplimiento con las leyes y regulaciones de patente de los firmantes del Tratado. Por ejemplo, tras la emisión de una patente de Estados Unidos basada en la presente solicitud o cualquier otra solicitud de Estados Unidos que reivindique prioridad de la presente o haga referencia a la presente, se retirarán irrevocablemente todas las restricciones sobre la disponibilidad del material depositado en la medida requerida por el Tratado de Budapest o por 35 U.S.C. § 112.

La construcción de un vector de expresión de PAM se describe en detalle más adelante. En los mapas plasmídicos, en la presente memoria, la región marcada "enzima alfa amidante" (véase, por ejemplo, Figura 5, el mapa plasmídico de pAE 73) tiene la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N° 1 adjunta al presente, y codifica un producto de traducción primario de 715 aminoácidos expuesto como SEC ID N° 2 adjunto a la presente. Ese producto de traducción incluye un péptido señal en los aminoácidos 1-25, una pro-región en 26-41, y una monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante madura en 42-715. La mayor parte de la enzima expresada y purificada de acuerdo con la invención continúa incluyendo la pro-región, y se ha demostrado que es muy eficaz.

Se detallan más adelante ejemplos de la línea celular que expresa PAM, su fermentación, desarrollo de procedimiento, purificación y uso.

Como se analiza en más detalle más adelante, se clonó un gen de PAM en el vector de expresión pSV402MT para crear el plásmido de expresión PAM pAE73. Las células CHO K1 se transfectaron con ADN de pAE73. Después de un procedimiento de selección dual y clonación de dilución limitante se amplificó adicionalmente una línea celular CHO con concentraciones crecientes de metotrexato. La línea celular adherente 73-26 se convirtió a un cultivo de suspensión sin suero, sin selección, UGL 73-26/M. Se creó un UGL 73-26/M MCB y MWCB en BioReliance Corp. Tanto el MCB como el MWCB se han caracterizado completamente y se consideran aceptables para la producción de PAM en una instalación de GMP. La línea celular UGL 73-26/M se ha adaptado para crecer en un biorreactor de tanque agitado. El desarrollo de la fermentación ha conducido a definir un procedimiento de inóculo que tarda 14 días en matraces de agitación. La fase de fermentación/cultivo celular es un procedimiento de 17 días. Los parámetros clave del procedimiento de fermentación son los siguientes: adición de glucosa (2 g/l) los días 5, 10 y 14, concentración de oxígeno disuelto ≥ 70 %, el pH de la fermentación para alcanzar su punto de referencia natural, y un medio de cultivo tisular de fuente no animal, sin proteínas, Sigma C5467, complementado con glutamina a una concentración final de 2 mM. Se desarrolló un procedimiento de purificación corriente abajo sencillo y robusto para la PAM a partir de medio de CHO acondicionado C5467. Se consigue rutinariamente después de la purificación un aumento de cuatro veces en la pureza y 40 % de recuperación global de enzima activa. El procedimiento utiliza sistemas de filtración convencionales y resinas de cromatografía de bioprocedimiento que son susceptibles de aumento de escala al nivel de fabricación. Los procedimientos de fermentación de cultivo celular completo y purificación corriente abajo se han aumentado de escala a un nivel de fabricación/planta piloto de 10 l. El procedimiento como se ha descrito debería ser susceptible a un procedimiento de fabricación validable para la producción de grandes cantidades de PAM.

Se desarrolló una línea celular CHO que expresaba grandes cantidades de PAM, UGL 73-26/M. El procedimiento de cultivo celular desarrollado para UGL 73-26/M era en un medio de fuente proteica no animal. Se prefirió un procedimiento de cultivo celular discontinuo sencillo. El objetivo del esquema de purificación fue desarrollar un procedimiento robusto y escalable con buenos rendimientos de enzima catalíticamente activa.

5

Construcción de vector

La creación del vector de expresión usado para generar la línea celular pAE73 se basó en resultados del trabajo de Friedman *et al.* Bio/Technology 7:359-362 (1989). Siguiendo el procedimiento descrito en este artículo, los inventores crearon los vectores de expresión pAE73 para ensayar. Los componentes principales de cada vector son el promotor de metalotioneína humana IIA (hMTIIA) (localizado en pHS1, recibido de M. Karin), el potenciador de SV40 (derivado de pSV40, ATCC) y el gen de enzima α -amidante descrito en la presente memoria.

10

Derivación de pAE73

15

pHS1

El plásmido de partida usado en la creación de pAE73 fue el plásmido pHS1 (Figura 1), un regalo de M. Karin en UCSD en febrero de 1990. El pHS1 se derivó en el laboratorio del Dr. Karin cortando y empalmado en pUC8 (Figura 2) el promotor de metalotioneína IIA humano. El fragmento de Hind III/Bam H1 de 846 pb se clonó en el sitio de Hind III-Bam H1 del sitio de clonación múltiple pUC8 (MCS). El plásmido resultante, pHS1, tiene el promotor de metalotioneína IIA humana insertado en el sitio de clonación múltiple.

20

pSV401MT y pSV402MT

25

pHS1 se convirtió en el vector de expresión pSV401MT o pSV402MT (Figura 3) insertando el potenciador de SV40 cadena arriba del promotor de metalotioneína humana. El fragmento de ADN del SV40 se preparó digiriendo ADN del plásmido pSV40 con Hind III. El fragmento de Hind III de 1167 pb se clonó en el sitio de Hind III de PHS 1. El potenciador de SV40 se asienta de forma asimétrica dentro del fragmento de ADN Hind III localizando de este modo el potenciador cerca o lejos del promotor de hMTIIA. La orientación del sitio Bgl I dentro del potenciador de SV40 en relación con el del gen de lacZ en el plásmido original determina la designación del plásmido. pSV401MT tiene el potenciador de SV40 lejos del promotor de hMTIIA y pSV402MT tiene el potenciador de SV40 cerca del promotor de hMTIIA. pSV402MT se seleccionó para construcción de vectores adicional.

30

pAE 73

35

pAE73 se preparó clonando el gen de enzima alfa-amidante (SEC ID N° 1) en el sitio Bam H1 de pSV402MT. El fragmento génico de α -AE de 2870 pb se aisló después de la digestión de pAE64 con endonucleasas de restricción de ADN Bgl 1 y Bam H1. El plásmido pAE64 contiene un gen PAM cadena abajo del promotor/potenciador de SV40 que se ha modificado para expresar una proteína PAM de 75 kDa soluble. Esta secuencia de ADN de PAM se ha usado en otra línea celular que expresa CHO, UGL B3/A1-7, para expresar la proteína PAM de 75 kDa. Se muestra derivación de la secuencia génica de PAM en la Figura 4.

40

El fragmento de ADN de 2870 pb se purificó y el extremo Bgl 1 del fragmento se modificó con dos fragmentos de oligonucleótidos de ADN complementarios (AE96/AE97) que convirtieron el extremo Bgl 1 del fragmento en un nuevo extremo Bam H1.

45

```
AE96 (+) 23 5 'GATCCATCGATCGCACTAGTGCC' 3'
AE97 (-) 16 5 'ACTAGTGCGATCGATG 3'
```

50

El fragmento de ADN de PAM modificado se clonó en el sitio Bam H1 del vector de expresión, pSV402MT. El fragmento de ADN de PAM con dos extremos Bam H1 pudo ligarse en el vector de expresión en orientación con sentido o antisentido, por lo tanto la orientación del gen de PAM se determinó por el mapeo de la digestión de restricción del plásmido con Eco R1. Un sitio Eco R1 tanto en el gen de PAM como en el vector de expresión permite un análisis sencillo del ADN plasmídico. El plásmido con el PAM en la orientación correcta se designó pAE73, y su mapa plasmídico se muestra en la Figura 5.

55

Creación de una línea celular que expresa enzima α -amidante

Transfección y clonación

60

Se usaron tres plásmidos en la transformación de células CHO K1: pAE73, pSV₂ neo y pSV₂ dhfr. Los plásmidos pSV₂ neo y pSV₂dhfr (ambos obtenidos de la ATCC) se usaron debido a que la incorporación de estos plásmidos por células transfectadas posibilita la selección sencilla de líneas celulares transformadas. El plásmido pSV₂ dhfr también se seleccionó específicamente porque la incorporación del ADN de dhfr/promotor de SV40 en el genoma de CHO posibilita la amplificación selectiva de ese gen y otros genes próximos. El gen para co-amplificar fue el gen de

65

enzima α -amidante portado en el plásmido pAE73. Las células CHO K1 se transformaron por precipitación con fosfato cálcico de ADN plasmídico. Los plásmidos se transfectaron en las células en una relación de 10:1:1, pAE73: pSV₂ neo: pSV₂ *dhfr*. Se añadieron 20 μ g de pAE73 por cada placa de 100 mm. Dos días después de la transfección, las células se cultivaron con presión selectiva en un medio que contenía G418 250 mg/l para permitir que sobrevivan solamente las células transformadas. El crecimiento celular de CHO en este medio requeriría incorporación estable del plásmido pSV₂ neo. Se añadió metotrexato al medio de cultivo 27 días después de la transfección, una vez que se estableció el crecimiento estable en medio selectivo G418. Los grupos de G418 de células transformadas se cultivaron en medio que contenía metotrexato 100 nM, 500 nM, 1 μ M o 5 μ M y G418 250 mg/l. Dos semanas después (seis semanas después de la transfección) se pudieron establecer focos aislados de células a partir de células cultivadas en metotrexato 5 μ M + medio G418 por cilindros de clonación. Se realizó un intento de establecer líneas celulares de veinticinco focos por este método, pero solamente dos focos crecieron después de la transferencia y esta técnica se abandonó. Se inició clonación de dilución limitante, 0,5 células/pocillo, al mismo tiempo a partir de células cultivadas en medio que contenía metotrexato 1 μ M + G418. Las células transformadas cultivadas en concentraciones menores de metotrexato se abandonaron. Tres semanas después de comenzar la dilución limitante los aislados de clonación se transfirieron a placas de 24 pocillos y después a placas de 100 mm para crecimiento expandido en un periodo de 2-3 días. Diez semanas después de la transfección inicial de células CHO K1, se estableció uno de los aislados designado 73-26. La línea celular se crioconservó y se evaluó la expresión de enzima α -amidante. 73-26 fue una de las líneas celulares de mejor producción en este momento que producen 6953 U/10⁶ células/día.

Amplificación de la línea celular 73-26

El clon primario de 73-26 se pasó para producir una línea celular establecida mantenida en medios que contenían metotrexato 1 μ M + G418. El fin de seleccionar el plásmido pSV₂ *dhfr* para transfección fue no solamente porque proporciona un segundo método de selección para identificar líneas celulares transformadas sino porque se ha establecido ampliamente que el mini-gen *dhfr* se amplifica cuando las células se cultivan a altas concentraciones de metotrexato. Unigene Laboratories tuvo experiencia previa con las líneas celulares transformadas con este plásmido que mostraba que podían requerirse concentraciones de metotrexato de 20-50 μ M para inducir la producción máxima de enzima α -amidante. La línea celular 73-26 con enzima α -amidante se dividió directamente en medio que contenía metotrexato 1 μ M, 20 μ M o 50 μ M. Todos los medios contenían también G418 como un segundo método de selección. La progresión de expresión de enzima α -amidante de esta línea celular en diversos intervalos de tiempo se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Amplificación y expansión de la línea celular CHO 73-26

Fecha	Línea Celular	Metotrexato (μ M)	α -AE (U/10 ⁶ células/día)	Actividad relativa a control de B3/A1-7	Comentarios
19/08/1991					línea celular cambiada a medio con concentraciones aumentadas de metotrexato
26/09/1991	73-26	1	15138		
	73-26	20	ND		crecimiento de línea celular lento
	73-26	50	ND		crecimiento de línea celular lento
28/10/1991	73-26	1	25000		
	73-26	20	6923		
	73-26	50	114162		
	73-26				
21-22/11/1991	B3-A1/7		5714/4087		
	73-26	1	73099/30065	16,5	
	73-26	20	55925/7570	5,8	
	73-26	50	22055/40937	7,0	
22/11/1991, 10/12/1991	B3-A1/7		3250/4087		
	73-26	1	15277	4,7	
	73-26	20	41898	12,9	
	73-26	50	96941	29,8	
26/04/1992	B3-A1/7		4692		
	73-26	1	22934/26340	5,2	
	73-26	20	24935/17237	4,5	
	73-26	50	47088/78462	13,4	

ND = No Determinado

Los datos de la Tabla 1 muestran los niveles de expresión aumentados de enzima α -amidante en esta línea celular en comparación con los de la línea celular B3/A1-7 previamente desarrollada. La co-amplificación del gen de enzima α -amidante y el gen *dhfr* es evidente por la capacidad de la línea celular para expresar más enzima con subcultivo continuado a concentraciones aumentadas de metotrexato. Las células cultivadas en presencia de metotrexato 20 μ M o 50 μ M tuvieron los mejores niveles de expresión después de 3-4 meses de amplificación selectiva. Cuando se subcultivaron continuamente durante varios meses, los niveles de expresión de enzima α -amidante se redujeron. Se usaron por lo tanto reservas tempranas congeladas de esta línea celular para líneas celulares adaptadas a la suspensión preparada.

10 **Caracterización de una línea celular que expresa enzima α -amidante adaptada a suspensión 73-26**

El último objetivo en el desarrollo de esta línea celular fue desarrollar un procedimiento que fuera estable sin la presión selectiva del metotrexato y G418. Otro atributo deseado de la línea celular fue que creciera a densidades de células relativamente altas en un cultivo en suspensión. El método usado para conseguir estos objetivos se describe a continuación.

15 **Preparación de líneas celulares sin selección, adaptadas a suspensión**

La preparación de células adaptadas a suspensión sin selección requirió que las células adherentes UGL 73-26 se privaran de suero, metotrexato y G418. Se desarrolló un ataque múltiple, Figura 5, para conseguir esta tarea; se estableció una matriz de retirada con el objetivo último de añadir el menor número posible de duplicación celular en la línea celular final. Se descongeló una congelación temprana, 16/12/91, de la línea celular de metotrexato 20 μ M 73-26 para establecer una línea celular sin selección, sin suero, adaptada a suspensión, para estudios de desarrollo posteriores. Aunque la actividad PAM en metotrexato 50 μ M fue algo mayor los intentos de restablecer una línea celular de 50 μ M 73-26 con crecimiento activo fueron infructuosos. La productividad de enzima α -amidante de la línea celular se evaluó antes de iniciar el protocolo de adaptación a suspensión, Tabla 2.

Tabla 2 Productividad de 73-26 20 μ M

Línea celular	α -AE (U/10 ⁶ células/día)
CHO K1	0
B3/A1-7	22.555
73-26	446.625

30 La actividad PAM de esta línea celular antes de adaptarla a cultivo de suspensión tuvo una actividad 20 veces mayor por célula que el control de B3/A1-7. La actividad enzimática tanto para la línea celular de control como para 73-26 fue 5-10 veces la observada en el ensayo original justo antes de la congelación de la línea celular, 16/12/91 (Tabla 1).

35 Se generaron cuatro nuevas líneas celulares sin suero, adaptadas a suspensión, como se muestra en la Figura 6. Las líneas celulares, designadas 73-26/KN se crioconservaron después de un procedimiento de 37 días.

Producción de enzima α -amidante de 73-26 adaptada a suspensión

40 Se descongelaron células almacenadas de las nuevas líneas celulares 73-26 (73-26/K, 73-26/L, 73-26/M, 73-26/N) y se cultivaron en matraces de agitación. Las líneas celulares se mantuvieron pasando las células tres veces por semana en medio Ex-Cell 301. A intervalos periódicos se realizó un intercambio de medio completo y una evaluación de 24 horas de la productividad enzimática evaluada por el ensayo α -AE. Las líneas celulares se mantuvieron durante hasta 80 días en cultivo. El procedimiento de lotes semi-continuo para la línea celular anterior, B3/A1-7, fue un procedimiento de 40 días y los inventores eligieron evaluar la estabilidad de producción de la línea celular al doble de longitud de este procedimiento. Los datos de este estudio se muestran en la Tabla 3. Durante el transcurso de este estudio la línea celular 73-26/L se terminó entre el día 22 y el día 40, todas las otras líneas celulares estaban creciendo de forma activa al final del periodo de 80 días.

Tabla 3 Productividad de enzima de líneas celulares adaptadas a suspensión 73-26/K-N

Línea celular	Días en cultivo	Actividad α -AE (U/10 ⁶ células/día)	α -AE real o media (U/10 ⁶ células/día)	Actividad relativa a B3/A1-7*
B3/A1-7	15	4907	5068	
	15	5778		
	17	4520		
	42	15697	15697	
	60	3773	3820	
	60	3867		
	70	12677		

ES 2 437 068 T3

	80	14246	14246		
73-26/K	20	16872	11836	2,34	
	20	10778			
	22	7859			
	40	8274			
	47	14944	11609	0,74	
	60	8616	5827,5	1,53	
	60	3039			
	70	10790	10790	0,85	
	80	1933	1933	0,14	
73-26/L	20	10163	8731	1,72	
	20	7076			
	22	8955			
73-26/M	20	14728	9954	1,97	
	20	8910			
	22	6223			
		40	44882	36391	2,32
		47	27900		
		60	24844	23580	6,17
		60	22316		
		70	46457	46457	3,66
		80	41246	41246	2,90
	73-26/N	20	10173	13686	2,70
20		15852			
22		15033			
		40	27368	26243	1,67
		47	25117		
		60	16175	22123	5,79
		60	28071		
		70	39082	39082	3,08
		80	6915	6915	0,49

Nota: Los días en periodos de ensayo de cultivo comparados son resultados de 15-22, 40-47, 60, 70 y 80.

Aunque todas las líneas celulares expresaron significativamente más enzima α -amidante que B3/A1-7 en los intervalos tempranos, < 40 días, solamente 73-26/M y 73-26/N aún producían grandes cantidades de enzima después de 70 días. Se seleccionó UGL 73-26/M para desarrollo adicional porque producía uniformemente más enzima α -amidante durante un periodo de 80 días. Las otras tres líneas celulares pararon de crecer antes del final del periodo de ensayo de 80 días o su productividad/célula/día se redujo durante los últimos 20 días.

Estudios de caracterización de almacenamiento de células, pre-almacenamiento, de CHO K1, UGL 73-26, UGL 73-26/M MCB y UGL 73-26/M MWCB00

Se realizaron estudios de caracterización en la línea celular hospedadora (CHO K1), una línea celular progenitora (73-26) y el banco de siembra UGL 73-26/M. El banco de siembra UGL 73-26/M de 40 frascos se preparó el 4/2/98. Cada frasco del banco de siembra contiene 4×10^6 células/ml en Ex-Cell 301 90 %/DMSO 10 %. Todos los estudios realizados se evaluaron como coherentes con los resultados requeridos de una línea celular CHO para convertirse en una MCB y MWCB, véase Tabla 4.

La línea celular UGL73-26/M del banco celular maestro se realizó en BioReliance Corp. Varios de los 118 frascos de MCB se usaron para una caracterización completa de la línea celular. Los resultados de todos los estudios de la UGL 73-26/M MCB son coherentes con una línea celular de origen CHO y negativa para agentes infecciosos. Se usó un frasco de la UGL 73-26/M MCB para crear un banco celular de trabajo del fabricante de 238 frascos, UGL 73-26/M MWCB00, en BioReliance Corp. Todos los resultados de estudios del UGL 73-26/M MWCB00 son coherentes con la línea celular de origen CHO y negativos para agentes infecciosos.

ES 2 437 068 T3

Tabla 4 Sumario de estudios de caracterización de células CHO

Fase de almacenamiento celular	Artículo de ensayo	Ensayo	Resultados	Fecha de compleción de laboratorio	Nº de informe
Pre-almacenamiento	CHO K1	Microscopía electrónica de transmisión	Negativo - sin células con partículas de tipo A y tipo C incipiente	23/08/1999	AA18UW.013000.PAI
	UGL 73-26	Microscopía electrónica de transmisión	Negativo - sin células con partículas de tipo A y tipo C incipiente	17/08/1999	AA18PK.013000.PAI
	Banco de semillas UGL 73-26/M	Esterilidad	Satisfactorio	17/02/1999	AA11VS.510000.BSV
		Micoplasma	Negativo	02/03/1999	AA11VS.102003.BSV
		Ensayo de PCR-MVM	Negativo	09/02/1999	AA11VS.105026.BSV
		Microscopía electrónica de transmisión	Negativo - 3 células con partículas de tipo A y tipo C incipiente	05/03/1999	AA11VS.013000.PAI
		Retrovirus murino - co-cultivo con células de pulmón de visón.	Negativo	14/09/1999	AA18UH.011001.BSV
		Repetición de microscopía electrónica de transmisión	Negativo - Sin células con partículas de tipo A y tipo C incipiente	15/09/1999	AA18UH.013000.PAI
Banco celular maestro	UGL 73-26/M MCB	Esterilidad	Satisfactorio	21/12/1999	AA24KX.510000.BSV
		Micoplasma	Negativo	03/01/2000	AA24KX.102003.BSV
		Isozima	Coherente con el origen de hámster chino	09/02/2000	AA24KE.380001.BSV
		Agentes adventicios <i>in vitro</i>	Negativo	09/02/2000	AA24KE.003000.BSV
		Virus no evidentes <i>in vivo</i>	Negativo	11/02/2000	AA24KE.005002.BSV
		Agentes adventicios <i>in vivo</i>	Negativo	15/02/2000	AA24KE.004005.BSV
		Microscopía electrónica de transmisión	Negativo - sin células con partículas de tipo A y tipo C incipiente	08/02/2000	AA24KE.013000.PAI
		Transcriptasa inversa	No informativo	01/15/2000	AA24KE.002000.BSV
		Retrovirus murino - co-cultivo con células de pulmón de visón	Negativo	01/02/2000	AA24KE.011001.BSV
		Retrovirus murino - Co-cultivo con células RD	Negativo	01/02/2000	AA24KE.011002.BSV
		Ensayo de PCR-MVM	Negativo	03/02/2000	AA24KE.105026.BSV
		MAP	Negativo	25/02/2000	AA24KE.004000.BSV
		Virus bovino <i>in vitro</i>	Negativo	04/02/2000	AA24KE.032004.BSV
		Parvovirus porcino <i>in vitro</i>	Negativo	04/02/2000	AA24KE.033004.BSV
Banco celular de trabajo del fabricante	UGL 73-26/M MWCB00	Esterilidad	Satisfactorio	24/03/2000	AA27LH.510000.BSV
		Micoplasma	Negativo	07/04/2000	AA27LH.102003.BSV
		Agentes adventicios <i>in vitro</i>	Negativo	26/04/2000	AA27LH.003031.BSV
		Virus no evidentes <i>in vivo</i>	Negativo	16/05/2000	AA27LH.005002.BSV

		Isozima	Coherente con el origen de hámster chino	21/04/2000	AA27LH.380001.BSV
--	--	---------	--	------------	-------------------

Estudios de desarrollo de proceso de UGL 73-26/M en matraces de agitación y biorreactores de tanque agitado

5 Puesto que los experimentos preliminares habían indicado que la productividad de la línea celular no podía mantenerse uniformemente durante un gran número de generaciones, se investigó un protocolo de fermentación discontinuo. Un protocolo discontinuo también ofrece las ventajas de facilidad de programación, cambio de escala más fácil y consecuencias menos drásticas del fallo de lote. El desarrollo del proceso de fermentación para UGL 73-26/M requirió la investigación de varios parámetros que podrían influir en la productividad celular de la línea celular.

10 El desarrollo de fermentación detallado más adelante muestra estudios fundamentales que investigan el oxígeno disuelto (OD), pH y complementación de medios. Los parámetros de fermentación no estudiados fueron RPM impulsor y temperatura de fermentación.

Efecto del oxígeno disuelto en la expresión de la enzima α -amidante

15 Se realizó un experimento para examinar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto del medio de cultivo de CHO en un matraz de agitación. Los matraces de agitación se sembraron con $0,1 \times 10^6$ células/ml. Dos matraces de agitación contenían 150 ml de medio en un matraz de agitación Techne de 250 ml, mientras que el tercer matraz de agitación contenía 250 ml de medio. Se tomaron mediciones diarias de oxígeno disuelto en todos los matraces de agitación. Se tomaron diariamente alícuotas de medio acondicionado clarificado para evaluación de la productividad de α -AE por el ensayo de α -AE. Se usaron dos medios de cultivo en este estudio, un medio de CHO bajo en proteínas (C1707, Sigma-Aldrich) y un medio de CHO sin proteínas (C5467, Sigma-Aldrich). La comparación directa de UGL 73-26/M cultivado en los dos medios se muestra en la Figura 7. El nivel de oxígeno disuelto en los dos cultivos fue notablemente diferente. Las células cultivadas en 150 ml de C1707 produjeron menos enzima total/ml

20 que las células cultivadas en un volumen equivalente de medio de cultivo de C5467. Aunque la concentración de oxígeno disuelto inicial del medio fue igual, ~ el 80 % OD, la concentración de oxígeno disuelto del cultivo de medio C5467 nunca bajó por debajo del 50 %. El contenido de OD del cultivo C1707 fue menor del 50 % el día 9 y la actividad máxima de cultivo fue dos días después. Estos datos indican que puede haber una correlación entre el contenido de OD/viabilidad celular/productividad de α -AE.

25 También se investigó el volumen de agitación como un parámetro crítico potencial. Debido a que el matraz de agitación no se mantiene a una concentración de oxígeno disuelto constante, la capacidad del cultivo para mantener oxígeno disuelto es relativa a la relación de superficie de cultivo:volumen. El aumento del volumen de cultivo de un agitador altera de forma apreciable la relación de superficie:volumen. Se iniciaron cultivos idénticos excepto que el volumen de cultivo en un agitador era de 150 ml (5467s) y el otro era de 250 ml (5467sa). El efecto de los cambios en la relación de superficie:volumen en el % OD y la productividad de α -AE se muestra en la Figura 8.

30 Los datos mostrados en la Figura 8 muestran que la productividad de cultivo está afectada en gran medida por el O_2 disuelto. Si la concentración de O_2 disuelto se reduce debido a la utilización por el cultivo o debido al efecto de las diferencias en la relación de superficie:volumen; cuando la concentración de OD es menor del 50 % el cultivo deja de expresar más enzima α -amidante en un periodo de 48-72 horas. El O_2 disuelto en el biorreactor debería mantenerse al 70 % para reflejar la concentración de oxígeno disuelto durante la fase del cultivo en la que las células son más sanas y productivas.

Efecto del medio en la expresión de la enzima α -amidante

35 Como parte de los estudios diseñados para facilitar la selección de la elección más apropiada de medio de cultivo para UGL 73-26/M o mientras se definían las condiciones de crecimiento del biorreactor se iniciaron numerosos cultivos de agitación con dos medios de cultivo de CHO, C1707 y C5467 (Sigma-Aldrich). Ambos medios de cultivo están definidos, C1707 es un medio bajo en proteínas con transferrina añadida al medio y C5467 es un medio de proteína no animal. Ambos medios, cuando se obtienen, requieren la adición de L-glutamina a una concentración final de 2 mM. La Tabla 5 a continuación muestra los datos de una gran toma de muestras de matraces de agitación con uno de los dos medios.

55 *Tabla 5 compendio de datos de cultivo de agitación con medio de cultivo de CHO C1707 y C5467*

Formulación de los medios	n =		Actividad enzimática máxima (unidades/ml)	Día de actividad máxima	Densidad celular máxima (10^6 células/ml)	Día de densidad celular máxima
C5467	21	Media	363366	15	1,48	11
		ETM	51708	0,5	0,11	0,6
C1707	12	Media	322691	14	1,92	10

	ETM	86045	2,9	0,66	3,0
--	-----	-------	-----	------	-----

Los datos en la Tabla 5 no muestran diferencia sustancial en la productividad enzimática de la línea celular UGL 73-26/M en cada uno de los medios. El medio de cultivo de CHO Sigma, C5467, puede ser la elección de medio que más cumple con la regulación con respecto a las directrices reguladoras futuras tanto en los Estados Unidos como en la Unión Europea debido a que no contiene componentes de medios de fuente animal. El medio de cultivo de CHO Sigma, C5467, es el medio de elección para futuros estudios.

Efecto de la glucosa en la expresión de la enzima α -amidante

Los estudios que investigan el estado de nutrientes de un cultivo discontinuo de UGL73-26/M revelaron que 4-5 días después del inicio de cultivo la concentración de glucosa en el medio fue aproximadamente el 50 % (2 g/l) de la de medio virgen. Se emprendió un estudio exhaustivo del efecto de la complementación de glucosa en la productividad enzimática como una serie de experimentos de matraz de agitación en los que se añadió glucosa adicional al cultivo. Los matraces de agitación se complementaron con 2 g/l de glucosa de 1 a 3 veces a intervalos temporales específicos. El efecto de la adición de glucosa en la productividad de α -AE se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6 Complementación de glucosa - expresión de enzima relativa

Actividad máxima - % de control						
Día de la adición de glucosa	00108	00110	2130-D-1001 Fairfield	2131-D-1001	2131-D-1002	Media
Ninguno	100	100	100	100	100	-
5	151		160			156
5, 10	235	162	144	111	65	143
5, 10, 15	197		192			195
8, 15	179		149			164

Tabla 7 Complementación de glucosa - día de mayor expresión de enzima

Día de mayor actividad						
Día de la adición de glucosa	00108	00110	2130-D-1001 Fairfield	2131-D-1001	2131-D-1002	Media
Ninguno	15	13	12	13	13	13
5	17					17
5, 10	19	19	13	23	17	18
5, 10, 15	19		15			17
8, 15	19		16			18

La adición de glucosa a un cultivo discontinuo de UGL 73-26/M aumentó la productividad máxima del cultivo en 50-100 % dependiendo del régimen de adición de glucosa. Los matraces de agitación que se complementaron con glucosa los días 5, 10 y 15 parecen expresar más enzima en comparación con controles no complementados. La productividad relativa media de estos cultivos fue de 195 % del control. Otros cultivos complementados eran solamente ligeramente menos productivos (143-164 %) que los complementados tres veces. Todos los cultivos que se complementaron con glucosa adicional mostraron concentraciones de enzima máximas retardadas en el medio. Las concentraciones de enzima máximas se observaron los días 17/18 para cultivos complementados con glucosa frente al día 13 en los cultivos de control no complementados, Tabla 7.

Efecto del pH en la expresión de la enzima α -amidante

El pH del medio acondicionado es una de las variables de procedimiento que puede controlarse en un biorreactor de tanque agitado que no puede abordarse en un matraz de agitación. En un matraz de agitación, se permite que el pH del cultivo descienda a medida que se consumen los componentes del medio y a medida que se producen productos secundarios celulares. El perfil del pH de dos matraces de agitación de 250 ml de UGL 73-26/M que contienen 150 ml (5467s) o 250 ml (5467sa) se muestran más adelante en la Figura 9. El pH del cultivo se redujo durante la primera parte del lote y después se elevó durante la última parte del cultivo. La reducción del pH probablemente se eleva a concentración de lactato aumentada en el cultivo al comienzo del cultivo. La elevación del pH al final del cultivo se debe a que las células catabolizan el lactato como fuente de carbono. La productividad del cultivo no se ve afectada por la reducción del pH (Figura 8).

Se procesaron varios biorreactores de tanque agitado de 6-10 l (n = 5) sin control de pH para imitar las condiciones en un matraz de agitación. Las células CHO en los biorreactores de tanque agitado se cultivaron en medio C5467, a 70 % de OD y a 37 °C. El perfil de pH medio del medio acondicionado en el biorreactor es similar al observado en los dos matraces de agitación, Figura 10. La concentración de oxígeno disuelto en el biorreactor se mantuvo a 70 % y la temperatura a 37 °C.

Además de los ciclos de biorreactor descritos anteriormente sin control de pH, se procesó una serie de biorreactores en los que se permitió que el pH del reactor descendiera libremente al punto de pH de referencia (entre 7,0-7,4). En el momento en que se alcanzó el pH deseado, este se mantuvo a ese pH durante la duración de la fermentación. Las células CHO en los biorreactores de tanque agitado se cultivaron en medio C5467, a 70 % de OD y 37 °C. El efecto de mantenimiento del control de pH en la productividad de α -AE en un biorreactor de tanque agitado se muestra en la Figura 11.

La Figura 11 muestra la actividad α -AE media en el biorreactor para cada día a lo largo del ciclo para los ciclos en los que no se inició un punto de referencia de pH. Los datos de ciclos individuales cuando se estableció el punto de referencia de pH solamente después de que el pH estuviera a una distancia de 0,5 unidades de pH del punto de referencia también se muestran en la Figura 11. Hay una clara correlación entre el pH de cultivo y la actividad enzimática. El perfil de actividad para el ciclo del biorreactor sin punto de referencia de pH es superior para todos los ciclos durante los 16 días iniciales de cultivo. La única excepción fue el perfil para el ciclo en el que el punto de referencia de pH era 7,1. La diferencia fue probablemente debido a que el cultivo duraba más tiempo que los otros ciclos. La actividad α -AE máxima para los estudios sin punto de referencia de pH medios fue de 280.707 unidades/ml el día 16.

No hubo efecto del pH en la densidad celular viable (datos no mostrados). Los cultivos crecieron hasta una densidad celular viable máxima de $1,0-1,5 \times 10^6$ células por ml. La densidad celular máxima se alcanzó de 8 a 10 días después de inocularse el biorreactor. No hubo efecto del pH en la viabilidad celular excepto para el cultivo procesado a pH 7,1 (datos no mostrados). La viabilidad del cultivo celular fue mayor del 50 % viable durante 15 o más días en el cultivo. El biorreactor que se procesó con un punto de referencia de pH de 7,1 mantuvo > 50 % de células viables durante 20 días en cultivo.

Sumario de investigación y desarrollo de parámetros de fermentación para UGL 73-26/M

Después del establecimiento de la línea celular que expresaba α -AE UGL 73-26/M, se realizó una serie de experimentos para definir parámetros críticos para la expresión óptima de la enzima α -amidante. Se determinó que un medio sin proteínas animales (Sigma, C5467) apoyaba altos niveles de expresión de la enzima. Las células CHO pudieron cultivarse como un cultivo discontinuo en medio C5467 complementado con L-glutamina a una concentración final de 2 mM. Sin embargo, el cultivo requiere complementación con D-glucosa para potenciar adicionalmente la productividad del cultivo. La complementación con glucosa óptima fue 2 g/l los días 5, 10 y 15. La concentración de OD del biorreactor debería mantenerse al 70 % y debería permitirse que el pH del biorreactor se ajuste al pH que está en función de la capacidad de tamponamiento del medio y el metabolismo de los componentes del medio por las células CHO.

Desarrollo de purificación corriente abajo de UGL 73-26/M

La siguiente sección resume el desarrollo de purificación corriente abajo de los inventores para PAM producida usando el clon de UGL 73-26/M. Solamente se incluyen en el sumario experimentos representativos que proporcionan una progresión lógica del trabajo de desarrollo del procedimiento. Se proporciona una breve descripción de cada etapa que describe la función de esa etapa en el procedimiento de purificación. Se analizaron ciclos de purificación usando SDS-PAGE (proteína constante y unidades constantes), ensayo de actividad PAM y ensayo de proteína de Bradford. Todos los experimentos se completaron antes de o poco después de la transferencia de tecnología a la instalación piloto de Boonton, NJ. Los métodos descritos en la presente memoria se usaron para preparar los lotes de PAM 1330-D-1003, 1330-D-1004, 1330-D-1005, 1330-D-1006, 1330-1009 y 1330-1010.

Filtración de flujo tangencial N° 1 (TFF 1)

Descripción de etapa: La etapa de TFF 1 se utiliza para concentrar y diafiltrar los medios de células CHO acondicionados antes de la cromatografía. El medio acondicionado se concentra y la conductividad se reduce por diafiltración para facilitar la unión con la columna de intercambio aniónico. La etapa de TFF 1 emplea un módulo de Pellicon 2 equipado con una membrana de celulosa regenerada PLCTK de 30 kDa (Millipore).

Investigación y desarrollo: La investigación inicial de esta etapa se centró en si sería necesaria o no TFF antes de la cromatografía. La reducción de la conductividad del medio de CHO acondicionado por dilución con agua se investigó como una alternativa a TFF. La incapacidad de diluir el medio acondicionado antes de la cromatografía provocó que una gran parte de la actividad PAM residiera en el flujo continuo después de la carga. La reducción de la conductividad del medio acondicionado a aproximadamente 5 mS minimizó la cantidad de actividad PAM detectada en el flujo continuo. Sin embargo, se identificaron dos problemas cuando el medio acondicionado se cargó directamente en la columna de intercambio aniónico. Uno de los componentes del medio se unió irreversiblemente a la columna y provocó una grave descoloración de la resina. Otro componente del medio que mostró enormes características de absorbancia de UV se eluyó conjuntamente con la actividad PAM después de la elución del gradiente.

Se diluyó medio de células CHO acondicionado (C5467) con agua para reducir la conductividad a aproximadamente 5 mS y se cargó directamente en una columna de Q-Sepharose FF (Pharmacia) equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La columna se sometió a un gradiente lineal de 100 % A (Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0) a 68 % B (Tris 50 mM, NaCl 475 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0) durante 60 minutos.

- 5 Apareció una banda de color oscuro grande en la parte superior de la columna inmediatamente después de la carga y permaneció durante el ciclo de cromatografía. La columna se limpió con NaCl 2 M y se saneó con NaOH 1,0 M. Los procedimientos de limpieza y saneamiento no consiguieron retirar la banda oscura de la columna. Posteriormente, la columna se sometió a un procedimiento de limpieza más riguroso. La columna se sometió a la siguiente serie de reactivos de limpieza: NaOH 0,5 M, NaCl 1 M, ácido acético 0,1 M, ácido acético 0,1 M, NaCl 1 M
- 10 y etanol al 70 %. Ninguna de las condiciones ensayadas fueron capaces de retirar la banda oscura de la columna (NEG:001:225-245). La banda coloreada se identificó como ácido aurintricarboxílico, un componente presente en medio C5467 virgen. Se cargó una solución de 6 mg/l (concentración de medio) de ácido aurintricarboxílico tamponado a pH 8,0 con TRIS directamente en una columna de Q-Sepharose FF equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La banda coloreada apareció en la parte superior de la columna inmediatamente
- 15 después de cargar. La columna se sometió a la misma elución de gradiente y procedimiento de limpieza descrito anteriormente. El ácido aurintricarboxílico permaneció unido a la columna de intercambio aniónico durante todo el proceso (NEG: 001:276-290). El ácido aurintricarboxílico polimeriza fácilmente en soluciones acuosas dando como resultado una macromolécula con una densidad de carga alta a pH 8,0. La macromolécula cargada negativamente aparentemente se une de forma irreversible a la columna de intercambio aniónico de forma muy similar al ADN. Las
- 20 aplicaciones repetidas de este material a la columna probablemente reduzcan la capacidad de carga, y por lo tanto influirán negativamente en el tiempo de vida global de la columna.

- Se descubrió que el segundo componente de medio eluía conjuntamente con la PAM. El medio no acondicionado o virgen se cargó directamente en la columna de Q-Sepharose FF que se equilibró con Tris 50 mM, NaCl 120 mM,
- 25 0,001 % de TX-100, pH 8,0. La columna se sometió de nuevo a las mismas condiciones de elución de gradiente descritas anteriormente. Se observó un gran pico de UV en la región en la que normalmente eluye la enzima (NEG: 001:248-257). El análisis de SDS-PAGE del pico purificado a partir del medio acondicionado reveló que el material era proteínas de bajo peso molecular o un componente de medio no proteínico (NEG: 001:225-245). El medio C5467 contiene hidrolizados proteicos que pueden explicar el pico de UV grande que coincide con el pico enzimático.
- 30 Ambos componentes del medio, el ácido aurintricarboxílico y el pico de UV no identificado, se retiran eficazmente antes de la cromatografía por TFF. La enzima se retiene (retenido) por la membrana de 30 kDa y los componentes del medio de bajo peso molecular pasan a través del filtro (permeado).

- El medio acondicionado se concentró 10 veces y se diafiltró usando un dispositivo Pellicon XL equipado con una
- 35 membrana de celulosa regenerada PLCTK de 30 kDa (Millipore). El material se diafiltró con 4-5 volúmenes de TRIS 25 mM, TX-100 0,0005 % pH 7,0 a una conductividad final de aproximadamente 3 mS. El material se cargó en una columna de Q-Sepharose FF equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La columna se sometió a elución de gradiente como se ha descrito anteriormente. No se observó descoloración de la resina y el pico de UV grande que eluía conjuntamente con la enzima estaba ausente. Se determinó que el % de recuperación y actividad específica del pico de enzima resultante era del 47 % y $2,1 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG: 004:263-283).
- 40

- Se investigó la estabilidad enzimática en diversos estadios de la etapa de TFF. El medio acondicionado se diafiltró inicialmente con TRIS 50 mM, TX-100 0,001 % pH 7,0 seguido de una concentración 5 veces. Se analizaron las
- 45 muestras de los resultados de diafiltración y concentración con respecto a pérdida de actividad y degradación. No se observó degradación por SDS-PAGE y se recuperó aproximadamente el 95 % de la actividad enzimática (NEG: 008:245-251).

Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

- 50 *Descripción de la etapa:* La etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) proporciona una purificación global de la PAM a partir del medio de células CHO acondicionado. La etapa principalmente retira proteínas de mayor peso molecular. Sin embargo, también se retiran algunas proteínas de bajo peso molecular, incluyendo formas truncadas de la enzima. La etapa de cromatografía produce rutinariamente una purificación de 2 a 3 veces
- 55 de la enzima. El % de recuperación de la enzima activa es normalmente del 50-75 %. El ADN que puede estar presente en la corriente de alimentación después de la fermentación de las células CHO se retira eficazmente en este estadio del procedimiento.

- Investigación y desarrollo:* Antes del desarrollo de la etapa de Q-Sepharose FF, los inventores investigaron brevemente la purificación de PAM usando cromatografía de intercambio catiónico (CEX). El uso de cromatografía
- 60 de CEX se investigó con y sin la etapa inicial de TFF. La purificación se llevó a cabo en una columna SP550C (TosoHaas) empleando fases móviles a pH 5,0 - 6,0. En cada caso, se produjo escasa resolución y recuperación; mucha de la actividad enzimática se identificó en el flujo continuo después de la carga (NEG: 004:006-029 y NEG: 004:102-119). No se consideró la reducción del pH de las fases móviles para facilitar la unión debido a la potencial
- 65 falta de estabilidad de la enzima a pH bajo. En este punto, se abandonó la cromatografía de CEX.

Se investigó una serie de ciclos de cromatografía de AEX que empleaban elución de gradiente en una columna de Q-Sepharose FF. Todas las purificaciones de Q-Sepharose FF se llevaron a cabo en una columna (1,1 x 13,7 cm) manejada a 180 cm/h. Al principio del desarrollo de la purificación, la disponibilidad del medio acondicionado nuevo estaba limitada; por lo tanto muchos de estos experimentos se realizaron con material congelado/descongelado. El medio acondicionado se concentró/diafiltró por TFF y se aplicó a la columna equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La columna se sometió a un gradiente salino lineal del 100 % A (Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0) al 68 % B (Tris 50 mM, NaCl 475 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0) durante 60 minutos. También se investigaron ciclos de gradiente similares que empleaban tampones HEPES a pH 7,0 o pH 8,5. Generalmente, los ciclos de gradiente produjeron poca purificación y dieron como resultado escasa actividad específica enzimática (NEG:004-139-156, NEG:005:119-132, NEG:009:009-022 y NEG:009:024-038). En muchos casos la actividad enzimática se propagó por todo el gradiente, quizás como resultado de glicosilación diferencial.

A medida que continúa el desarrollo, se investigaron métodos de elución por etapas usando etapas salinas secuenciales en la columna de Q-Sepharose FF. Se cargó medio acondicionado concentrado/diafiltrado en una columna de Q-Sepharose equilibrada con TRIS 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La columna se sometió a elución por etapas secuencial con NaCl 175 mM, NaCl 225 mM y NaCl 275 mM. La actividad enzimática se distribuyó por igual entre las etapas salinas de 175 mM y 225 mM, con un % de recuperación global de aproximadamente el 41 %. El análisis por SDS-PAGE reveló la presencia de enzima de 75 kDa en las fracciones de NaCl tanto 175 mM como 225 mM (NEG: 005:198-211). La actividad enzimática en ambas etapas salinas puede deberse a diferencias en la glicosilación o quizá formas truncadas de la enzima que conservan la actividad.

Se usó medio acondicionado nuevo de matraces de agitación o ciclos de biorreactor de 10 l durante el resto de los experimentos de intercambio aniónico. Se sometió medio de CHO acondicionado del matraz de agitación 00020S3 a TFF y después se cargó en la Q-Sepharose FF equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La enzima se eluyó de la columna con una única etapa salina, Tris 50 mM, NaCl 225 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. El % de recuperación y valores de actividad específicos del pico recogido fueron del 34 % y $1,9 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG: 008:021-033). De forma similar, el medio de CHO acondicionado de un biorreactor de 10 l (00021BR, el día 14) se sometió a TFF y purificación en la Q-Sepharose usando una única etapa de NaCl 225 mM. Los valores de % de recuperación y actividad específica para este ciclo fueron de 37 % y $2,3 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG:008:065-075).

También se investigó la elución por etapas usando fases móviles de HEPES en un intento de mejorar la recuperación de enzima activa. Se realizaron ciclos de purificación por duplicado que empleaban HEPES 50 mM, NaCl 225 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0 como el tampón de elución. Se usó medio de CHO acondicionado de un ciclo de biorreactor de 10 l (instalación piloto de Boonton, ciclo N° 1 día 15) como el material de entrada para estos ciclos de purificación. El % de recuperación y la actividad específica para ambos ciclos de purificación fueron aproximadamente 60 % y $3,0 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG: 008:263-288). El uso de fases móviles de HEPES aparentemente mejoró el % de recuperación y pureza de la enzima.

Se investigó el efecto de la viabilidad celular en la purificación de Q-Sepharose FF. Se comparó la purificación de medio de CHO acondicionado de un ciclo de biorreactor de 10 l (B00101) recogido el día 14 y el día 21. Se midió la viabilidad celular el día 14 y día 21 y se determinó que era de 95 % y 48 %, respectivamente. Se sometió el medio de CHO acondicionado del día 14 y día 21 a TFF y purificación por Q-Sepharose FF usando HEPES 50 mM, NaCl 225 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0 como el tampón de elución por etapas. La purificación del material del día 14 dio como resultado una recuperación de 49 % y una actividad específica de $2,15 \times 10^6$ U/mg, mientras que el ciclo del día 21 produjo recuperación de 40 % y $2,1 \times 10^6$ U/mg (NEG: 009:114-125 y NEG: 009:149-166). También se llevaron a cabo purificaciones usando medio de CHO acondicionado de un ciclo de biorreactor de 10 l (00107BR) el día 12 y día 15. Se midió la viabilidad celular el día 12 y día 15 y se determinó que eran de 86 % y 80 %, respectivamente. En cada caso, la enzima se eluyó de la columna de Q-Sepharose FF con Tris 50 mM, NaCl 225 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. El material del día 12 dio como resultado una recuperación de 62 % y una actividad específica de $1,9 \times 10^6$ U/mg, mientras que el material el día 15 dio una recuperación de 54 % y una actividad específica de $4,3 \times 10^6$ U/mg (NEG: 009:195-203 y NEG: 009:227-236). La viabilidad celular no parecía tener un efecto significativo en el % de recuperación global o la actividad específica de la enzima después de cromatografía de AEX.

Se identificaron e investigaron parámetros críticos para la cromatografía de Q-Sepharose FF para establecer intervalos de trabajo. Se definieron e investigaron escenarios diseñados para ensayar el procedimiento de purificación para determinar el impacto sobre la recuperación y pureza de la enzima. Se compararon dos ciclos de purificación de Q-Sepharose FF usando diferentes tampones de elución por etapas, bien TRIS 50 mM, NaCl 250 mM, TX-100 0,001 % pH 7,8 o bien TRIS 50 mM, NaCl 200 mM, TX-100 0,001 % pH 8,2 (pH bajo/sal alta y pH alto/sal baja). El fundamento para estos experimentos fue someter la cromatografía a condiciones de elución extremas para definir los intervalos de trabajo. Se usó medio de CHO acondicionado tratado con TFF de un ciclo de biorreactor de 10 l (2132-D-1004) como la entrada para purificaciones. En el escenario de pH bajo/sal alta, el medio acondicionado se cargó en la columna equilibrada con TRIS 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 7,8. La enzima se eluyó de la columna con TRIS 50 mM, NaCl 250 mM, TX-100 0,001 % pH 7,8. Los valores de % de recuperación y actividad específica de la enzima fueron del 66 % y $2,0 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG: 010:151-

161). El medio acondicionado en el escenario de pH alto/sal baja se cargó en la columna equilibrada con TRIS 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,2 y se eluyó con TRIS 50 mM, NaCl 200 mM, TX-100 0,001 % pH 8,2. El % de recuperación y actividad específica de la enzima en este caso fueron del 66 % y $2,4 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG: 010:140-150). Basándose en estos datos, la columna de Q-Sepharose FF puede manejarse a un intervalo de pH de [7,8-8,2] y la concentración de cloruro sódico en el tampón de elución puede variar entre [NaCl 200 mM y 250 mM].

Se estableció una capacidad de trabajo para la columna de Q-Sepharose FF para ayudar en el aumento de escala de la purificación para ciclos de biorreactor de 30 l. La capacidad de trabajo de la columna se definió de dos maneras: [unidades de enzima/ml de resina] y [mg de proteína/ml de resina]. El avance para este experimento se definió como un total de ≥ 10 % de la actividad enzimática identificada en el flujo continuo y las etapas de lavado. Se cargó medio de CHO acondicionado (100 ml) que se había sometido a TFF (2132-D-1002) en una columna de Q-Sepharose FF equilibrada con TRIS 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. Se determinó que la actividad enzimática y concentración proteica del medio acondicionado era de $1,97 \times 10^5$ U/ml y 2,41 mg/ml, respectivamente. La columna de AEX (Millipore Vantage-L, 1,1 x 13,7 cm) se operó a una velocidad lineal de 180 cm/h. La elución por etapas se llevó a cabo con TRIS 50 mM, NaCl 225 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. Se identificó menos del 1 % de la actividad enzimática total en las etapas de lavado y flujo continuo de la columna. Se recuperó aproximadamente el 51 % de las unidades enzimáticas en el pico principal. Basándose en un volumen de columna de 13,0 ml, se calculó que la capacidad de trabajo era [$1,51 \times 10^7$ U/ml de resina] o [18,5 mg de proteína/ml de resina] (NEG:010:081-092). Se planean experimentos futuros para determinar una verdadera capacidad de carga de la etapa de Q-Sepharose FF.

Cromatografía de interacción hidrófoba (Fenil-Sepharose FF, sustitución baja) *Descripción de la etapa:* La etapa de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) retira la mayor parte de las impurezas proteicas restantes después de la etapa de AEX y proporciona una purificación doble adicional. Los análisis de SDS-PAGE después de HIC revelaron una única banda principal con algunas impurezas de menor peso molecular menores. Normalmente, el % de recuperación de enzima activa después de HIC es de 50 – 75 %.

Investigación y Desarrollo: El procedimiento de purificación desarrollado para PAM producida a partir del clon B3/A1-7 también utilizó HIC. Se emplearon fases móviles que contenían sulfato de amonio para promover la interacción ligando-proteína. La exposición prolongada de la enzima a tampones que contenían sulfato de amonio dio como resultado una precipitación impredecible y desnaturalización enzimática. Se investigaron otras sales en la serie de Hofmeister, tales como cloruro sódico y citrato sódico, en un intento de minimizar estos problemas.

Se investigaron inicialmente gradientes lineales inversos utilizando fases móviles que contenían cloruro sódico. Los materiales de entrada para estos estudios de cromatografía fueron resultados de TFF 1 o resultados de Q-Sepharose FF. Se investigó la HIC directa después de la etapa de TFF inicial en un intento de eliminar la etapa de AEX. Normalmente, la enzima se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 20 mM, NaCl 4 M pH 7,0. La dilución con agua antes de la adición de sales reduce la concentración proteica minimizando la posibilidad de precipitación provocada por "adición de sales". El material diluido se cargó en una columna de fenil-Sepharose FF equilibrada con TRIS 10 mM, NaCl 2,0 M pH 7,0. La enzima se eluyó de la columna con un gradiente lineal inverso del 100 % A (TRIS 10 mM, NaCl 2,0 M pH 7,0) a 100 % B (TRIS 10 mM, pH 7,0) durante 68 minutos. Generalmente, el % de recuperación de enzima activa fue aproximadamente del 50 % (NEG: 005:170-185 y NEG: 005:212-226).

También se investigaron los métodos de elución por etapas empleando las fases móviles de cloruro sódico. La enzima sometida a TFF 1 o cromatografía de Q-Sepharose FF se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 20 mM, NaCl 4 M pH 7,0. El material diluido se cargó en una columna de HIC equilibrada con TRIS 10 mM, NaCl 2 M pH 7,0. La columna se lavó con tampón de equilibrado adicional seguido de un lavado con TRIS 10 mM, NaCl 1,0 M pH 7,0. La enzima se eluyó de la columna con TRIS 10 mM, NaCl 400 mM pH 7,0. El rendimiento de la enzima activa fue bueno pero solo se consiguió purificación marginal (NEG:008:034-046 y NEG: 008:135-148). El uso de cloruro sódico no parecía provocar "precipitación de proteínas por adición de sales" como sucedió con sulfato de amonio, sin embargo, la enzima se desnaturalizó a lo largo del tiempo en concentraciones altas de cloruro sódico.

Se descubrió que el citrato sódico promovía la unión de la enzima con la columna de HIC a concentraciones relativamente bajas. El medio de CHO acondicionado sometido a TFF se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 20 mM, citrato sódico 1,0 M pH 7,0 y se cargó en una columna de fenil-Sepharose FF equilibrada con TRIS 10 mM, citrato sódico 0,5 M pH 7,0. La columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y se desprendió con TRIS 10 mM, pH 7,0. No se identificó actividad enzimática en las fracciones de lavado o flujo continuo de la columna. Se identificó aproximadamente el 50 % de la actividad enzimática en la fracción de TRIS 10 mM pH 7,0 (NEG: 005:064-076). Este experimento se repitió usando una concentración final menor de citrato sódico. A la menor concentración salina, la enzima se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 20 mM, citrato sódico 0,6 M pH 7,0 antes de cargar en la columna de HIC equilibrada con TRIS 10 mM, citrato sódico 300 mM pH 7,0. La columna se cargó con tampón de equilibrado adicional y se desprendió con TRIS 10 mM pH 7,0. Los resultados fueron esencialmente idénticos al ciclo previo; no se identificó

actividad en las fracciones de lavado o flujo continuo (NEG:008:203-213).

Se investigó la elución de gradiente usando el sistema tampón de citrato sódico para ayudar en el desarrollo de un método de elución por etapas. Se diluyó un resultado de TFF con un volumen igual de agua seguido de un volumen
 5 igual de TRIS 20 mM, citrato sódico 0,6 M pH 7,0 antes de cargar en la columna equilibrada en TRIS 10 mM, citrato sódico 300 mM pH 7,0. La columna se sometió a un gradiente lineal inverso de 100 % A (TRIS 10 mM, citrato sódico 300 mM pH 7,0) a 100 % B (TRIS 10 mM, pH 7,0) durante 70 minutos. Se identificó un pico de actividad enzimática cerca del final del gradiente. Otras impurezas proteicas también se eluyeron en este área del gradiente y se
 10 extendieron a la tira de columna TRIS 10 mM pH 7,0 (NEG:008:252-262). La elución por etapas se examinó para conseguir mejor separación entre la enzima y las proteínas que eluían la tira de TRIS 10 mM pH 7,0.

La fracción máxima (NaCl de 225 mM) de una purificación de Q-Sepharose FF (ciclo de biorreactor de 10 l, 00107BR, día 12) se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 50 mM, citrato sódico 600 mM pH 7,0. El material diluido se cargó en una columna de fenil-Sepharose equilibrada con TRIS 25 mM,
 15 citrato sódico 300 mM pH 7,0. La columna se lavó con tampón de equilibrado adicional, seguido de un segundo lavado con TRIS 25 mM, citrato sódico 75 mM pH 7,0 y se desprendió con TRIS 25 mM pH 7,0. Toda la actividad enzimática se identificó en la fracción de citrato sódico 75 mM. Se calculó que el % de recuperación y la actividad específica eran del 42 % y $2,0 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG:009:204-218). Se consiguió mejor resolución entre la enzima y otras impurezas proteicas usando este método.

HIC inmediatamente después de TFF (sin etapa de AEX) se abandonó debido a la ineficacia de la etapa para eliminar ADN de la corriente de alimentación en bruto. Se realizaron cuatro purificaciones de HIC usando el método de elución por etapas de cloruro sódico detallado anteriormente. La aportación para estos ciclos fue medio de CHO
 20 acondicionado B3/A1-7 que se había sometido a TFF antes de la cromatografía. La especificación de ADN interna de los inventores en el momento fue < 10 ng/mg de proteína. En cada caso, se descubrió que el nivel de ADN residual presente en el pico enzimático principal después de HIC era 6 - 10 veces mayor que la especificación, haciendo de este modo la purificación de HIC por etapas individual inaceptable (NEG:006:137-159, NEG:006:176-187 y NEG:006:192-200).

Se investigó una capacidad de trabajo para la etapa de purificación de HIC para ayudar en el intento de aumento de escala a 30 l. El avance se definió como la presencia de ≥ 10 % de la actividad enzimática en las fracciones de lavado o de flujo continuo de la columna. La producción de Q-Sepharose (125 ml, 0,368 mg/ml, 710.563 U/ml) del ciclo de producción 1330-D-1003 se diluyó con un volumen igual de agua seguido de un volumen igual de TRIS 50 mM, citrato sódico 0,6 M pH 7,0. El material diluido se cargó en una columna de fenil-Sepharose FF (Millipore
 35 Vantage-L, 1,1 x 15,8 cm) equilibrada con TRIS 25 mM, citrato sódico 300 mM pH 7,0. La columna se manejó a 180 cm/h. La columna se lavó con tampón de equilibrado adicional y la enzima se eluyó con TRIS 25 mM, citrato sódico 75 mM pH 7,0. No se identificó actividad enzimática en las fracciones de lavado o el flujo continuo. El pico máximo contenía aproximadamente 75 % de las unidades de actividad enzimática y se calculó que la actividad específica era de $2,6 \times 10^6$ U/mg. Basándose en un volumen de columna de 15,0 ml, se calculó que la capacidad de trabajo era de $5,92 \times 10^6$ U/ml de resina (NEG:010:111-124). No se indicó una capacidad de trabajo [mg de proteína/ml de resina] debido a que la carga proteica de la columna era extremadamente baja después de AEX. Se planean estudios adicionales para determinar una verdadera capacidad de carga para la etapa de HIC.

El tiempo global para la operación de unidad de HIC se acortó drásticamente eliminando la dilución en agua y aumentando el caudal de funcionamiento a 240 cm/h de 180 cm/h. Minimizar el tiempo de exposición a citrato sódico y la cantidad de tiempo gastado en la resina puede ayudar en última instancia a reducir la pérdida de enzima activa. El resultado de Q-Sepharose FF de 1330-D-1003 se diluyó con un volumen igual de TRIS 50 mM, citrato sódico 0,6 M pH 7,0 y se purificó usando el método de elución por etapas de HIC descrito en el párrafo anterior. Se calculó que el % de recuperación y la actividad específica del pico principal (TRIS 25 mM, citrato sódico 75 mM pH 7,0) era de
 50 77 % y $2,4 \times 10^6$ U/mg, respectivamente (NEG:010:125-139). No se observó precipitación proteica durante o después de la dilución con citrato, sin embargo el material debe diluirse lentamente para evitar el fenómeno de "precipitación de proteínas por adición de sales".

El método de HIC se exploró modificando las concentraciones salinas de las fases móviles para establecer intervalos de trabajo. El efecto en el % de recuperación y actividad específica enzimática se investigó realizando dos procedimientos de purificación diferentes. En el primer ciclo, la concentración de citrato durante la carga y la elución se redujo mientras que en el segundo ciclo la concentración de citrato durante la carga se redujo mientras que la concentración de citrato en el tampón de elución se aumentó. Se diluyó el resultado de Q-Sepharose FF de un ciclo de biorreactor de 10 l (1330-D-1005) con un volumen igual de TRIS 50 mM, citrato sódico 0,5 M pH 7,0 y se cargó
 60 en una columna de HIC equilibrada con TRIS 25 mM, citrato sódico 250 mM pH 7,0. La columna se lavó con TRIS 25 mM, citrato sódico 50 mM pH 7,0. Se identificó aproximadamente el 51 % de la actividad enzimática en la fracción de citrato sódico 50 mM con menos del 1 % identificado en las fracciones de lavado y el flujo continuo. Se calculó que la actividad específica de la enzima en el pico principal era de $1,35 \times 10^6$ U/mg (NEG:010:175-186). En el segundo ciclo de HIC, el resultado de Q-Sepharose FF se diluyó y se cargó como se ha descrito anteriormente, sin embargo se empleó TRIS 25 mM, citrato sódico 100 mM pH 7,0 como el tampón de elución. En este caso, se identificó el 50 % de la actividad enzimática en la fracción de citrato 100 mM y se identificó menos del 2 % en las

fracciones de lavado y flujo continuo. La actividad específica de la enzima en la fracción de citrato 100 mM fue de $2,5 \times 10^6$ U/mg (NEG:010:163-174). La actividad específica menor observada en el primer ciclo de HIC sugirió que la reducción de la concentración de citrato en el tampón de elución provocó que proteínas adicionales que normalmente se encontraban en la tira eluyeran conjuntamente con la enzima, reduciendo de este modo la pureza final. Por el contrario, el aumento de la concentración de citrato en el tampón de elución no parecía reducir la pureza. Basándose en estos datos, la concentración de citrato sódico en el tampón de elución puede variar entre 75 y 100 mM sin comprometer la pureza final.

Filtración de flujo tangencial N° 2 (TFF 2)

Descripción de etapa: se utiliza TFF 2 para concentrar y diafiltrar la producción de fenil-Sepharose FF antes de la filtración de virus. La producción de HIC se sometió a TFF inmediatamente para minimizar la inactivación de la enzima por almacenamiento prolongado en el tampón de elución (TRIS 25 mM, citrato sódico 75 mM pH 7,0). El resultado de fenil-Sepharose FF se concentra aproximadamente 3 veces y se diafiltra para situar la enzima en un tampón adecuado para filtración de virus y almacenamiento posterior. La etapa de TFF 2 emplea un módulo Pellicon 2 equipado con una membrana de celulosa regenerada PLCTK de 30 kDa (Millipore).

Investigación y Desarrollo: El procedimiento de TFF 2 se desarrolló originalmente para la PAM producida usando el clon B3/A1-7. Se ha mostrado que la enzima es estable en TRIS 50 mM, NaCl 25 mM, TX-100 0,0005 % pH 8,0 en diversas condiciones, por esta razón, no se intentó I + D adicional.

Purificación a pequeña escala representativa de la PAM de medio de CHO acondicionado C5467

Una muestra de medio de células CHO acondicionado (500 ml) de un ciclo de biorreactor de 10 l (00107BR, día 15) se concentró 8 veces y se diafiltró frente a TRIS 50 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. Se purificó aproximadamente un tercio de la producción de TFF 1 usando una versión a escala reducida del procedimiento de purificación descrito anteriormente (NEG:009:219-249). Los datos de purificación se resumen en la Tabla 8. Los rendimientos de etapa para este ciclo de purificación fueron relativamente bajos y la actividad específica de la enzima se redujo de hecho después de la etapa de HIC. Sin embargo, el análisis de SDS-PAGE reveló que la enzima α -amidante global se purificó a una única banda principal a aproximadamente 75 kDa (Figura 12, carril 10). El gel y la exploración de densitometría (Figura 13) claramente indicaron que la enzima es altamente pura (aproximadamente 67 % de pureza) con solamente impurezas de bajo peso molecular menores presentes. La enzima se inactivó a lo largo del tiempo en muchos de los tampones de purificación; por lo tanto la ejecución del procedimiento debe realizarse sin retardo entre las etapas. La variabilidad en el procedimiento de purificación se atribuyó a la presencia de enzima inactiva, que reduce el rendimiento global y la actividad específica. Los que es más importante, tanto el desarrollo de la purificación como de la fermentación se realizaron simultáneamente, lo que también puede explicar parte de la variabilidad observada. Se ha descubierto posteriormente que los rendimientos de la etapa y la actividad específica en la escala de producción son mucho mejores, quizá como resultado de mover el material a través del procedimiento más rápido y ensayar las fracciones inmediatamente.

Tabla 8 Purificación a pequeña escala de PAM de medio de CHO acondicionado UGL 73-26/M

Etapas del procedimiento	Rendimiento (U)	Rendimiento de etapa (%)	Rendimiento global (%)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
TFF N° 1	5,89E +07	ND	ND	36,16	1,63E +06
AEX	3,17E +07	53,7	53,7	7,42	4,27E +06
HIC	1,09E +07	34,5	18,5	4,25	2,57E +06
TFF N° 2	8,18E +06	74,8	13,9	2,41	3,39E +06

Compendio de procedimiento de purificación corriente abajo de PAM

Los procedimientos de purificación para cada etapa del procedimiento que refleja la información que se envió a la instalación piloto en la transferencia de tecnología se detallan más adelante. Se incluyen datos de un ciclo de purificación a pequeña escala representativo, incluyendo el SDS-PAGE y exploración densitométrica, en la Tabla 8 y las Figuras 11 y 12.

Procedimiento de TFF 1: El medio de células CHO acondicionado clarificado se concentra 5 veces y se diafiltra con TRIS 50 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0 hasta que se consigue una conductividad final de 4-6 mS. La presión transmembrana se mantiene a $\leq 68,95$ kPa durante toda la filtración.

Procedimiento de AEX: El medio de células CHO acondicionado clarificado que se ha concentrado/diafiltrado por TFF se aplica a una columna de Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) equilibrada con TRIS 50 mM, NaCl 120 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. La columna se maneja a 180 cm/h y la absorbancia de UV se supervisa a 280 nm. La columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la PAM se eluye de la columna con TRIS 50 mM, NaCl 225 mM pH 8,0. La columna se limpia con NaCl 2,0 M y se sanea con NaOH 1,0 M. La columna se almacena entre ciclos en NaOH 10 mM.

Procedimiento de HIC: La producción de Q-Sepharose se diluye con un volumen igual de TRIS 50 mM, citrato 600 mM pH 7,0 y se carga en una Fenil-Sepharose FF (Amersham Biosciences) equilibrada con TRIS 25 mM, citrato 300 mM pH 7,0. La columna se maneja a 240 cm/h y la absorbancia de UV se controla a 280 nm. La columna se lava con TRIS 25 mM, citrato 300 mM pH 7,0 y la PAM se eluye de la columna con TRIS 25 mM, citrato 75 mM pH 7,0. La columna se limpia y sana con TRIS 25 mM pH 7,0 y NaOH 1,0 M, respectivamente. La columna se almacena entre ciclos en NaOH 10 mM.

Procedimiento de TFF 2: La producción de Fenil-Sepharose FF se concentra inicialmente aproximadamente 3 veces, se diafiltra con TRIS 50 mM, NaCl 25 mM, TX-100 0,0005 % pH 8,0 y se concentra adicionalmente a un volumen adecuado para filtración de virus y almacenamiento.

Ciclos de procedimiento de biorreactor de tanque agitado de 10 l

Visión de conjunto del procedimiento de fermentación y purificación de 10 l para la enzima α -amidante

Se preparó α -AE purificada después de varios ciclos de biorreactor de tanque agitado de 10 l. Las etapas del procedimiento para derivar la enzima α -amidante fueron una fase de inóculo de 14 días, una fase de fermentación de 17 días y un esquema de purificación de 2 días, detallados anteriormente y en la Figura 14. El medio de cultivo usado en estos experimentos fue un medio de CHO sin proteínas, C5467 (Sigma-Aldrich). Todos los detalles del procedimiento de estos ciclos pueden encontrarse en los registros de lote apropiados.

El diagrama de flujo del procedimiento, Figura 14, ilustra las etapas de procedimiento finales desarrolladas para α -AE/PAM producida usando el clon UGL 73-26/M.

Fase 1 - Inóculo

Para preparar un inóculo para un biorreactor de tanque agitado de 10 l se descongeló un único frasco del UGL 73-26/M MWCB00. Las células del cryovial se retiraron y se colocaron en medio nuevo. El sedimento celular se resuspendió en medio nuevo y se añadió a un matraz de agitación que contenía medio de CHO C5467. Durante los siguientes 14 días el cultivo se expandió en cuatro matraces que contenían 400 ml de medio más células (véase esquema de inóculo, Figura 15). El cultivo se ensayó con respecto a expresión de α -AE al final de la fase de inóculo 12. El día 12, la concentración de actividad enzimática media fue > 13.000 U/ml, véase Tabla 9 panel C. Se realizó un recuento celular del cultivo y la viabilidad celular cada vez que se modificó el cultivo del inóculo. La viabilidad del cultivo fue en general mayor del 95 % durante esta fase, véase Tabla 9 panel A. El recuento de células viables totales medias en cultivo de inóculo fue de $2,03 \times 10^9$ el día 14, véase Tabla 9 panel B.

Tabla 9 Estadística de cultivo celular – Fase de inóculo
Panel A

Porcentaje de viabilidad celular (%)							
Día del inóculo	2130-1003	2130-1004	2130-1005	2130-1006	2130-1009	2130-1010	Global
3	98,0	97,5	100,0	98,0	98,5	98,5	
5	98,5	97,5	98,5	98,0	100,0	96,5	
7	97,5	97,5	97,0	98,5	99,0	99,0	
10A	98,0	99,0	98,5	97,0	99,0	98,0	
10B	98,0	98,0	97,5	98,5	99,0	98,5	
12A	98,5	100,0	98,5	99,0	97,5	99,0	
12B	98,5	100,0	99,0	100,0	98,0	99,0	
12C	97,5	100,0	97,0	98,5	98,5	97,5	
12D	98,0	100,0	97,5	99,5	99,0	98,5	
14A	97,5	100,0	93,5	97,5	100,0	95,0	
14B	96,5	100,0	97,5	99,5	98,0	96,0	
14C	98,0	100,0	99,0	98,0	99,0	97,0	
14D	96,0	100,0	98,5	97,5	98,0	97,0	
Media del día 14	97,0	100,0	97,1	98,1	98,8	96,3	97,9
DT							1,7

Panel B

Número total de células viables ($\times 10^7$)							
Día del inóculo	2130-1003	2130-1004	2130-1005	2130-1006	2130-1009	2130-1010	Global
3	3,6	1,5	1,3	2,2	1,6	2,4	
5	14,7	6,3	5,7	6,1	5,5	6,3	

ES 2 437 068 T3

7	28,3	20,6	12,5	22,0	15,4	25,4	
10A	34,0	38,0	29,8	38,0	32,0	40,0	
10B	32,0	38,0	35,6	37,0	33,0	33,0	
12A	34,0	40,0	34,0	40,0	33,0	40,0	
12B	29,7	44,0	32,0	41,0	32,0	34,0	
12C	24,0	48,0	31,0	37,0	28,0	30,0	
12D	25,8	48,0	30,0	37,0	28,0	30,0	
14A	38,0	67,0	56,0	48,0	44,0	45,0	
14B	37,0	78,0	58,0	52,0	55,0	43,0	
14C	39,0	44,0	53,0	58,0	42,0	40,0	
14D	30,0	70,0	72,0	60,0	49,0	40,0	
Total del día 14	144,0	259,0	239,0	218,0	190,0	168,0	203,0
DT							43,7

Panel C

Actividad enzimática (U/ml)							
Día del inóculo	2130-1003	2130-1004	2130-1005	2130-1006	2130-1009	2130-1010	Global
12A	13.112	15.630	12.301	14.408	10.093	11.951	
12B	13.398	16.532	14.478	14.380	9.363	10.201	
12C	13.456	16.224	13.569	15.450	9.563	11.306	
12D	12.905	16.057	15.568	13.014	9.490	12.183	
Media del día 12	13.1218	16.111	13.979	14.313	9.627	11.410	13.110
DT							2.255

Fase 2 - Fermentación

5 Se inició un biorreactor de 10 l tras la finalización de cada fase de inóculo. El biorreactor se sembró a 1×10^5 células/ml en medio sin proteínas virgen con L-glutamina (Sigma, C5467). Los parámetros de biorreactor se establecieron en los siguientes puntos de referencia: temperatura = 37 °C, RPM = 60, pH = ningún punto de referencia de pH mantenido, se permitió que el pH se desplazara (al comienzo no se permite que el pH sea mayor de pH 7,5) y el punto de referencia de OD es el 70 % de OD. La concentración de oxígeno disuelto del medio virgen fue mayor de 70 %, se permitió que la concentración de oxígeno disuelto del biorreactor se desplazara a 70 % y después se mantuvo en ese punto de referencia. El biorreactor se complementó con 2 g/l de glucosa los días 5, 10 y 14. El medio acondicionado se recogió el día 17. El material recogido se clarificó mediante un filtro Opticap de Millipore. Las primeras dos fermentaciones descritas más adelante se recogieron el día 18 en lugar del día 17, 2131-D-1003 y 2131-D-1004. La densidad celular máxima del cultivo se alcanzó y se mantuvo entre los días 10 y 17/18. La densidad celular máxima media de estas fermentaciones fue de $1,5-1,6 \times 10^6$ células/ml, Tabla 10 Panel B. La viabilidad del cultivo fue > 80 % para los 14 días iniciales de cultivo y la viabilidad media el día de recogida fue de 76,0 %, Tabla 10 Panel A. La productividad del cultivo se evaluó en el momento de recogida, día 17/18. El recogido clarificado medio contenía 378.567 unidades α -AE/ml, Tabla 10 Panel C.

10

15

20

Tabla 10 Estadística de cultivo celular - Fase de fermentación

Panel A										
Porcentaje de viabilidad celular (%)										
Día de fermentación	2131-1003	2131-1004	2131-1005	2131-1006	2131-1009	2131-1010	Media	DT		
3	97,5	99,0	96,0	100,0	96,5	97,5	97,8	1,5		
5	98,5	99,0	99,0	98,5	98,5	98,5	98,7	0,3		
10	95,0	95,5	92,5	91,0	94,0	93,0	93,5	1,7		
14	93,5	86,5	82,5	83,5	86,0	91,0	87,2	4,3		
17/18	73,5	72,5	75,0	74,5	78,5	82,0	76,0	3,6		
Panel B										
Densidad de células viables (células/ml x 10 ⁶)										
Día de fermentación	2131-1003	2131-1004	2131-1005	2131-1006	2131-1009	2131-1010	Media	DT		
3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,1		
5	0,6	0,6	0,8	0,7	0,8	0,4	0,7	0,1		
10	1,2	1,3	1,9	1,9	1,4	1,5	1,5	0,3		
14	0,9	1,1	2,0	1,9	1,9	1,6	1,6	0,5		
17/18	1,4	1,3	2,0	1,4	1,9	1,5	1,6	0,3		
Panel C										
Actividad enzimática (U/ml)										
Día de fermentación	2131-1003	2131-1004	2131-1005	2131-1006	2131-1009	2131-1010	Media	DT		
17/18	412.120	398.397	371.950	505.269	383.975	319.693	378.567	61.174		

Fase 3 - Purificación

- El procedimiento de purificación tiene 5 etapas distintas como se ha detallado anteriormente. El material recogido clarificado se concentró y se diafiltró frente a TRIS 50 mM, TX-100 0,001 % pH 8,0. El material enzimático se concentró aproximadamente 4 veces de media (datos no mostrados, véase registros de lote). Este material del procedimiento se aplicó a una columna de Q-Sepharose y se eluyó siguiendo un gradiente por etapas de NaCl en un tampón de TRIS 50 mM, Triton 0,001 % que contenía NaCl 225 mM. La solución enzimática se diluyó con TRIS 50 mM, citrato 600 mM, pH 7,0 y se aplicó a una columna de fenil sepharose. La enzima α -amidante se eluyó de la columna después de un gradiente por etapas de citrato. El material enzimático se concentró a un volumen final de aproximadamente 1 l. Cuatro de los seis lotes de enzima se procesaron a través de un filtro de retirada de virus. Se procesaron dos lotes a través de un filtro Millipore NFP (1330-D-1005 y 1330-D-1006) y dos lotes a través de un filtro Pall Trincor DV50 (1330-1009 y 1330-1010). Los datos de cada una de las etapas del procedimiento se muestran en la Tabla 11 posterior.
- La primera etapa, TFF 1, fue una etapa casi cuantitativa con respecto a la retención de unidades de actividad de enzima α -amidante. El concentrado de TFF de un ciclo de biorreactor de 10 l tiene una actividad específica media de $1,60 \times 10^6$ unidades/mg de proteína, Tabla 11. El concentrado de TFF 1 que se ha aplicado a una columna de cromatografía de Q-Sepharose se eluyó de la columna en aproximadamente 3 l. La actividad específica de la enzima ha aumentado en esta etapa del procedimiento aproximadamente 2 veces a $3,33 \times 10^6$ unidades/mg. La concentración proteica y la concentración de actividad enzimática del eluato de Q-Sepharose fueron muy uniformes, véase Tabla 11. Después de la cromatografía de fenil-sepharose la actividad específica media de la enzima aumentó de $3,33 \times 10^5$ a $4,96 \times 10^6$ unidades/mg de proteína. El eluato de fenil-sepharose se concentró a 1 l usando una segunda etapa de TFF. No hay cambios en la actividad específica después de esta etapa de concentración, Tabla 11. Los concentrados de TFF 2 de algunos lotes enzimáticos se aplicaron a un filtro de retirada de virus. Las actividades específicas para 3 de los 4 lotes de la enzima se redujeron, Tabla 11. La actividad específica media para la enzima purificada final se redujo en 350.000 unidades/mg a $4,61 \times 10^5$ unidades/mg de proteína. La reducción de la actividad específica fue probablemente debida a inactivación de alguna parte de la enzima.

Tabla 11 Etapa del procedimiento de purificación individual

TFF 1

Nº de lote	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1330-D-1003	3.575.083	1,850	1.932.477
1330-D-1004	1.308.056	0,572	2.286.811
1330-D-1005	1.545.462	1,106	1.397.344
1330-D-1006	1.560.833	1,244	1.254.689
1330-1009	1.244.457	0,925	1.345.359
1330-1010	1.533.800	1,481	1.035.652
Media	1.794.615	1,196	1.512.055
DT	882.523	0,443	470.265
% de CV	49,2	37,0	30,5

Q Sepharose FF

Nº de lote	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1330-D-1003	710.563	0,244	2.912.143
1330-D-1004	808.386	0,222	3.641.378
1330-D-1005	778.492	0,255	3.052.910
1330-D-1006	816.303	0,204	4.001.485
1330-1009	778.864	0,243	3.205.202
1330-1010	807.958	0,257	3.143.805
Media	783.428	0,238	3.326.154
DT	39.140	0,021	412.162
% de CV	5,0	8,7	12,4

Tabla 11 continuación

Fenil Sepharose FF

Nº de lote	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1330-D-1003	274.877	0,093	2.955.667
1330-D-1004	413.767	0,057	7.259.070
1330-D-1005	168.186	0,029	5.799.517
1330-D-1006	296.924	0,080	3.711.550
1330-1009	357.854	0,075	4.771.387
1330-1010	325.502	0,062	5.250.032
Media	306.185	0,066	4.957.871
DT	83.338	0,022	1.528.801
% de CV	27,2	33,7	30,8

TFF 2

Nº de lote	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1330-D-1003	919.409	0,255	3.605.525
1330-D-1004	1.325.542	0,309	4.289.780
1330-D-1005	1.081.522	0,220	4.916.009
1330-D-1006	1.560.058	0,315	4.952.565
1330-1009	2.085.104	0,363	5.744.089
1330-1010	1.423.017	0,355	4.008.499
Media	1.399.109	0,303	4.586.078
DT	408.277	0,056	770.328
% de CV	29,2	18,5	16,8

Tabla 11 continuación

Filtración viral

Nº de lote	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1330-D-1003			
1330-D-1004			
1330-D-1005	989.040	0,196	5.046.122
1330-D-1006	1.124.322	0,298	3.772.893
1330-1009	1.528.944	0,300	5.096.480
1330-1010	1.577.241	0,349	4.519.315
Media	1.304.887	0,286	4.608.703
DT	292.541	0,064	615.313
% de CV	22,4	22,5	13,4

5

Los datos que ilustran la uniformidad de cada etapa de un procedimiento de purificación son importantes. Sin embargo, es tan importante el porcentaje de recuperación del producto deseado en cada etapa del procedimiento. La Tabla 12 muestra el porcentaje de recuperación para cada etapa del procedimiento de purificación de enzima α -amidante y el rendimiento global del procedimiento después de cuatro o cinco de las etapas del procedimiento. La Tabla 12 muestra que la enzima se recuperó cuantitativamente de ambas de las etapas de TFF. El porcentaje medio de recuperaciones de las etapas de cromatografía, Q-Sepharose y fenil-sepharose, son del 65,3 % y 72,0 %, respectivamente. Ambos de los filtros de retirada de virus ensayados recuperaron ~ 80 % de la actividad α -AE. El rendimiento global del procedimiento de purificación enzimática de material recogido clarificado mediante TFF 2 o filtración viral fue del 40,8 % o 38,8 %, respectivamente.

10

Tabla 12 Estadística de cultivo celular – Fase de purificación

Nº de lote	Etapa del procedimiento de purificación (% de recuperación)							Filtración viral	Recuperación total mediante TFF 2	Recuperación total mediante filtración viral DV50
	TFF 1	Q-Sepharose	Fenil-sepharose	TFF 2	Fenil-sepharose	TFF 2	Filtración viral			
1330-D-1003	193	33	37	138				33		
1330-D-1004	88	87	59	90				41		
1330-D-1005	117	57	76	79		91		39	36	
1330-D-1006	69	90	80	77		77		38	29	
1330-1009	95	66	90	92		80		52	42	
1330-1010	122	59	90	91		114		42	48	
Media	114,0	65,3	72,0	94,5		90,5		40,8	38,8	
DT	43,3	21,1	20,6	22,3		16,8		6,3	8,1	

Conclusiones

Se ha desarrollado una línea celular CHO bien caracterizada estable, UGL 73-26/M, que expresa altos niveles de actividad α -AE. Se consiguen altos niveles de expresión enzimática en un procedimiento de fermentación discontinuo de 17 días, que utiliza un medio de cultivo tisular que contiene proteína baja, de fuente no animal C5467 (Sigma). Se han investigado y optimizado parámetros de fermentación críticos tales como pH, OD y concentración de glucosa. También se desarrolló un procedimiento de purificación corriente abajo de dos etapas robusto que es capaz de purificar la enzima casi hasta la homogeneidad. La uniformidad de los procedimientos de fermentación y purificación está bien adaptada para el aumento de escala al nivel de fabricación.

Se exponen a continuación ejemplos que muestra la producción de producto amidado usando PAM expresada por células de la invención.

Ejemplo 1: Conversión de fragmento de hormona paratiroidea extendida con glicina a su homólogo amidado usando monooxigenasa peptidilglicina alfa amidante.

Amidación de rhPTH(1-34)Gly35-OH usando piruvato

Los componentes y concentraciones finales usados para amidación de rhPTH(1-34)Gly35-OH se muestran en la Tabla 12. A continuación hay una breve descripción de la amidación.

Tabla 12 α -amidación de rhPTH(1-34)Gly35-OH	
Reactivo	Concentración final
rhPTH(1-34)Gly35-OH	2 mg/ml
MES 250 mM pH 6,3	30 mM
Sulfato cúprico 3 mM	0,5 μ M
Ascorbato sódico 100 mM	2 mM
Oxígeno	La concentración de oxígeno disuelto se mantiene en o cerca de la saturación.
Piruvato sódico 400 mM	8 mM
Yoduro potásico 250 mM	5 mM
Etanol de 190 grados	1 %
PAM	30.000 U/ml

- Se cargaron aproximadamente 12,4 gramos de rhPTH(1-34)Gly35-OH en 1900 ml de MES 25 mM, NaCl 200 mM pH 6,0, en un frasco de vidrio equipado con un agitador y rociador de gas.
- A esta solución se añadieron los siguientes componentes en el orden enumerado: 3025 ml de agua, 741 ml de MES 250 mM pH 6,3, 1,03 ml de sulfato cúprico 3 mM, 124 ml de yoduro potásico, 62 ml de etanol de 190 grados, 124 ml de piruvato sódico 400 mM y 124 ml de ascorbato sódico 100 mM.
- El frasco de reacción se situó en un baño de agua y la mezcla de reacción se calentó a 25-27 °C con agitación.
- El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5,8 con 21 ml de HCl 2 M. Se inició el rociado de oxígeno; la velocidad de rociado se ajustó para evitar excesiva formación de espuma de la mezcla de reacción.
- Se añadieron 47 ml de PAM y la mezcla de reacción se incubó a 25-27 °C durante 4 horas y 35 minutos (se realizó rociado de oxígeno durante todo el periodo de incubación).
- La mezcla de reacción se acidificó a pH 2,4 con 74 ml de HCl 2 M.

La enzima PAM usada en este ejemplo se expresó de las células CHO K1 de la invención, construidas como se ha descrito anteriormente, y designadas en la presente memoria UGL 73-26/M. Esta línea celular también se usó para proporcionar el depósito de ATCC analizado anteriormente.

El precursor extendido con glicina puede obtenerse de fuentes conocidas, o puede producirse de maneras conocidas. Por ejemplo, puede producirse por fermentación de una manera análoga a la descrita en la Patente de Estados Unidos 6.103.495 (Ejemplos 1-2 de la misma), y purificarse como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.103.495 (Ejemplo 3 de la misma) antes de la amidación. El precursor particular usado en la presente amidación descrita anteriormente se expresó por una línea celular de la Solicitud de Patente de Estados Unidos relacionada N° de serie 11/076.260, presentada el 9 de marzo de 2005, y publicada el 6 de octubre de 2005 como Publicación N° US 2005/0221442.

En casos en los que la enzima usada para amidación sea monooxigenasa peptidil glicina alfa-hidroxilante (PHM), puede usarse la misma mezcla de reacción que la descrita anteriormente, sustituyendo PAM por PHM. Además, al final del periodo de incubación de 4 a 6 horas, el pH de la mezcla de reacción se aumenta mediante la adición de base entre 8 y 9. La mezcla de reacción se agita durante 4 a 8 horas adicionales antes de terminar la reacción. Puede obtenerse PHM expresando PAM como se enseña en la presente memoria, seguido de separar el dominio catalítico de PHM del resto de la molécula de PAM. Como alternativa, los vectores usados en la presente memoria

pueden modificarse para detener la traducción después de PHM pero antes del dominio catalítico de PAL. Como alternativa, el vector puede construirse, en el primer caso, con una región codificante de PHM en lugar de la región codificante de PAM analizada anteriormente. Puede obtenerse PHM expresando solamente la parte N terminal de PAM (aproximadamente los primeros 40 kDa). Las PAM y la localización de sus dominios catalíticos se indican en la bibliografía. Se cree que cualquiera de dichas PAM o PHM son útiles de acuerdo con la presente invención. Véase por ejemplo, Mizuno *et al*, BBRC Vol. 148, N° 2, páginas 546-52 (1987), la divulgación de la cual se incorpora en la presente memoria por referencia. Véase especialmente "AE1" de Mizuno. Se sabe que la piel de rana expresa PHM de forma natural.

10 Ejemplo 2: Purificación post-amidación

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

Se consiguió purificación de rhPTH (1-34)-NH₂ a partir de rhPTH(1-34)Gly35-OH residual usando cromatografía de CEX. Se describe más adelante una breve descripción del método de cromatografía de CEX. El resultado de la amidación acidificada se cargó en una columna Toyopearl SP650M (Tosoh Bioscience LLC), 9 cm x 19 cm, equilibrada con MES 25 mM pH 6,5. La columna se manejó a 180 cm/h y la absorbancia de UV del efluente de la columna se controló a 280 nm. La columna se lavó con MES 25 mM pH 6,5 hasta que el pH del efluente de la columna volvió a 6,5. La columna se lavó con MES 25 mM, NaCl 80 mM, pH 6,5 hasta que el pico de lavado se eluyó completamente y se consiguió una línea basal de UV estable. El producto, rhPTH(1-34)-NH₂, se eluyó de la columna con MES 25 mM, NaCl 200 mM pH 6,5. Se recogió el pico de UV completo; las fracciones se exploraron mediante RP-HPLC para determinar los criterios de agrupamiento.

Cromatografía de fase inversa (RP)

Se utilizó cromatografía de RP para intercambiar la forma salina del péptido de cloruro a acetato; la cromatografía de RP proporciona purificación marginal del péptido. La producción de cromatografía de CEX se diluyó con 3 volúmenes de acetato sódico 333 mM y se mezcló exhaustivamente. Se permitió que la mezcla reposara durante 75 minutos a temperatura ambiente antes de su carga. La muestra diluida en acetato se cargó en una columna Amberchrom CG300 M (Tosoh Bioscience LLC), 6 cm x 17 cm, equilibrada con acetato sódico 250 mM pH 7,5. La columna se manejó a 180 cm/hora y la absorbancia de UV del efluente de columna se controló a 280 nm. La columna se lavó con acetato sódico 250 mM pH 7,5 durante 60 minutos. La columna se equilibró en ácido acético 0,1 %. El producto, rhPTH(1-34)-NH₂, se eluyó de la columna con ácido acético 0,1 %, etanol 40 %. Se recogió el pico de UV completo.

Caracterización de rhPTH(1-34)-NH₂

La producción de cromatografía de RP se concentró en un polvo floculante blanco por liofilización, produciendo 11,8 gramos (95 % del rendimiento global de la amidación) de rhPTH(1-34)-NH₂. Se determinó que la masa molecular de rhPTH(1-34)-NH₂ era de 4.116,9 Da mediante espectrometría de masas de ionización por electronebulización (IEN-EM), que era coherente con la masa molecular media calculada de 4.116,8 Da.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Miller, Duncan A.
Mehta, Nozer M.
Consalvo, Angelo P.

<120> LÍNEAS CELULARES PARA EXPRESAR ENZIMA ÚTIL EN LA PREPARACIÓN DE PRODUCTOS AMIDADOS

<130> P/546-367

<150> 60/693.612
<151> 24-06-2005

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 2868
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<220>
<221> CDS
<222> (58)..(2205)

<400> 1

ES 2 437 068 T3

gatccatoga tcgcactagt gcccgccac tgcccgctgc cctggctctg cgcggac 57
atg gcc gga cgc gcc cgc agc ggt ctg cta ctg ctg ctg ggg ctg 105

Met Ala Gly Arg Ala Arg Ser Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

ctc gcc ctg cag agc agc tgc ctg gcc ttc aga agc cca ctt tct gtc 153

Leu Ala Leu Gln Ser Ser Cys Leu Ala Phe Arg Ser Pro Leu Ser Val

20 25 30

ttt aag agg ttt aaa gaa act acc aga tca ttt tcc aat gaa tgc ctt 201

Phe Lys Arg Phe Lys Glu Thr Thr Arg Ser Phe Ser Asn Glu Cys Leu

35 40 45

ggt acc att gga cca gtc acc cct ctt gat gca tca gat ttt gcg ctg 249

Gly Thr Ile Gly Pro Val Thr Pro Leu Asp Ala Ser Asp Phe Ala Leu

50 55 60

gat att cgc atg cct ggg gtt aca cct aaa gag tct gac aca tac ttc 297

Asp Ile Arg Met Pro Gly Val Thr Pro Lys Glu Ser Asp Thr Tyr Phe

65 70 75 80

tgc atg tcc atg cgt ctg cct gtg gat gag gaa gcc ttc gtg att gac 345

Cys Met Ser Met Arg Leu Pro Val Asp Glu Glu Ala Phe Val Ile Asp

85 90 95

ttc aag cct cgt gcc agc atg gat act gtc cac cat atg ctg ctg ttt 393

Phe Lys Pro Arg Ala Ser Met Asp Thr Val His His Met Leu Leu Phe

100 105 110

gga tgc aat atg ccc tog tcc act gga agt tac tgg ttt tgt gat gaa 441

Gly Cys Asn Met Pro Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Trp Phe Cys Asp Glu

115 120 125

gga acc tgt aca gat aaa gcc aat att cta tat gcc tgg gca agg aat 489

Gly Thr Cys Thr Asp Lys Ala Asn Ile Leu Tyr Ala Trp Ala Arg Asn

130 135 140

gct ccc ccc acc cgg ctc ccg aaa ggt gtt gga ttc aga gtt gga gga 537

Ala Pro Pro Thr Arg Leu Pro Lys Gly Val Gly Phe Arg Val Gly Gly
 145 150 155 160

gaa act gga agc aaa tac ttc gtc ctt caa gtt cac tat ggc gat atc 585

Glu Thr Gly Ser Lys Tyr Phe Val Leu Gln Val His Tyr Gly Asp Ile
 165 170 175

agt gct ttt cga gat aat cac aaa gac tgc tct ggc gtg tcc gta cat 633

Ser Ala Phe Arg Asp Asn His Lys Asp Cys Ser Gly Val Ser Val His
 180 185 190

ctc aca cgt gtg ccc cag cct tta att gcg ggc atg tac ctt atg atg 681

Leu Thr Arg Val Pro Gln Pro Leu Ile Ala Gly Met Tyr Leu Met Met
 195 200 205

tct gtt gac act gtc ata cca cca gga gag aaa gta gtg aat gct gac 729

Ser Val Asp Thr Val Ile Pro Pro Gly Glu Lys Val Val Asn Ala Asp
 210 215 220

att tcg tgc caa tac aaa atg tat cca atg cat gtg ttt gcc tac aga 777

Ile Ser Cys Gln Tyr Lys Met Tyr Pro Met His Val Phe Ala Tyr Arg
 225 230 235 240

gtc cac act cac cat tta ggt aag gtg gtg agc gga tac aga gta aga 825

Val His Thr His His Leu Gly Lys Val Val Ser Gly Tyr Arg Val Arg
 245 250 255

aac gga cag tgg aca ctg att gga cgc cag aac ccc cag ctg cca cag 873

Asn Gly Gln Trp Thr Leu Ile Gly Arg Gln Asn Pro Gln Leu Pro Gln
 260 265 270

gct ttc tac cct gtg gaa cac ccc gtt gat gtt act ttt ggt gat ata 921

Ala Phe Tyr Pro Val Glu His Pro Val Asp Val Thr Phe Gly Asp Ile
 275 280 285

ctg gca gcc aga tgt gtg ttc act ggt gaa ggg agg aca gag gcc acc 969

Leu Ala Ala Arg Cys Val Phe Thr Gly Glu Gly Arg Thr Glu Ala Thr

290 295 300

cat atc ggc ggc act tct agt gac gaa atg tgt aac ctg tac atc atg 1017

His Ile Gly Gly Thr Ser Ser Asp Glu Met Cys Asn Leu Tyr Ile Met

305 310 315 320

tat tac atg gaa gcc aaa tat gca ctt tcc ttc atg acc tgt aca aag 1065

Tyr Tyr Met Glu Ala Lys Tyr Ala Leu Ser Phe Met Thr Cys Thr Lys

325 330 335

aac gtg gct cca gat atg ttc aga act atc cca gca gag gcc aat atc 1113

Asn Val Ala Pro Asp Met Phe Arg Thr Ile Pro Ala Glu Ala Asn Ile

340 345 350

cca att cct gtc aaa ccg gac atg gtt atg atg cac ggg cat cac aaa 1161

Pro Ile Pro Val Lys Pro Asp Met Val Met Met His Gly His His Lys

355 360 365

gaa gca gaa aac aaa gaa aag agt gct tta atg cag cag cca aaa cag 1209

Glu Ala Glu Asn Lys Glu Lys Ser Ala Leu Met Gln Gln Pro Lys Gln

370 375 380

gga gag gaa gaa gta tta gag cag gat ttc cat gtg gaa gaa gaa ctg 1257

Gly Glu Glu Glu Val Leu Glu Gln Asp Phe His Val Glu Glu Glu Leu

385 390 395 400

gac tgg cct gga gtg tac ttg tta cca ggc cag gtt tct ggg gtg gcc 1305

Asp Trp Pro Gly Val Tyr Leu Leu Pro Gly Gln Val Ser Gly Val Ala

405 410 415

ctg gat tct aag aat aac cta gtg att ttc cac aga ggt gac cat gtt 1353

Leu Asp Ser Lys Asn Asn Leu Val Ile Phe His Arg Gly Asp His Val

420 425 430

tgg gat gga aac tct ttt gac agc aag ttt gtt tac cag caa aga ggt 1401

Trp Asp Gly Asn Ser Phe Asp Ser Lys Phe Val Tyr Gln Gln Arg Gly

435 440 445

ctt ggg cca att gaa gaa gac acc atc ctg gtc att gac cca aat aat 1449

Leu Gly Pro Ile Glu Glu Asp Thr Ile Leu Val Ile Asp Pro Asn Asn

450 455 460

gct gaa atc ctc cag tcc agt ggc aag aac ctg ttt tat tta cca cac 1497

Ala Glu Ile Leu Gln Ser Ser Gly Lys Asn Leu Phe Tyr Leu Pro His

465 470 475 480

ggc ttg agc ata gat aca gat gga aat tat tgg gtc aca gat gtg gct 1545

Gly Leu Ser Ile Asp Thr Asp Gly Asn Tyr Trp Val Thr Asp Val Ala

485 490 495

ctc cac cag gtg ttc aaa ttg gac ccg cat agc aaa gaa ggc cct ctc 1593

Leu His Gln Val Phe Lys Leu Asp Pro His Ser Lys Glu Gly Pro Leu

500 505 510

tta att ctg gga agg agc atg caa cct ggg agt gac caa aat cat ttc 1641

Leu Ile Leu Gly Arg Ser Met Gln Pro Gly Ser Asp Gln Asn His Phe

515 520 525

tgc cag ccc acc gat gtg gct gtg gag ccc agt act gga gct gtc ttc 1689

Cys Gln Pro Thr Asp Val Ala Val Glu Pro Ser Thr Gly Ala Val Phe

530 535 540

gtg tca gac ggt tac tgt aac agt ogg att gtg cag ttt tca cca agc 1737

Val Ser Asp Gly Tyr Cys Asn Ser Arg Ile Val Gln Phe Ser Pro Ser

545 550 555 560

gga aag ttc gtc acc cag tgg gga gaa gag tcc tct gga agc agt cct 1785

Gly Lys Phe Val Thr Gln Trp Gly Glu Glu Ser Ser Gly Ser Ser Pro

565 570 575

agg cca ggc cag ttc agt gtt cct cac agt ttg gcc ctt gtg cct cat 1833

Arg Pro Gly Gln Phe Ser Val Pro His Ser Leu Ala Leu Val Pro His

580 585 590

ttg gac cag ttg tgt gtg gca gac agg gaa aat ggc cga atc caa tgc 1881

Leu Asp Gln Leu Cys Val Ala Asp Arg Glu Asn Gly Arg Ile Gln Cys

595 600 605

ttc aaa act gac acc aaa gaa ttt gtg aga gag att aag cac gca tca 1929

Phe Lys Thr Asp Thr Lys Glu Phe Val Arg Glu Ile Lys His Ala Ser

610 615 620

ttt gga agg aat gtc ttt gcc att tca tat ata cca ggt ttc ctc ttt 1977

Phe Gly Arg Asn Val Phe Ala Ile Ser Tyr Ile Pro Gly Phe Leu Phe

625 630 635 640

gcc gta aac ggg aag cct tac ttt gga gac caa gag ccc gtg caa gga 2025

Ala Val Asn Gly Lys Pro Tyr Phe Gly Asp Gln Glu Pro Val Gln Gly

645 650 655

ttt gtg atg aac ttt tcc agt ggg gaa att ata gac gtc ttc aag cca 2073

Phe Val Met Asn Phe Ser Ser Gly Glu Ile Ile Asp Val Phe Lys Pro

660 665 670

gta cgc aag cac ttc gac atg cct cat gat att gtg gct tct gaa gat 2121

Val Arg Lys His Phe Asp Met Pro His Asp Ile Val Ala Ser Glu Asp

675 680 685

ggg act gtg tac att gga gac gca cac aca aac acc gtg tgg aag ttc 2169

Gly Thr Val Tyr Ile Gly Asp Ala His Thr Asn Thr Val Trp Lys Phe

690 695 700

acc ctg act gaa aaa atg gag cat cgg tca gtc taa aaggctggca 2215

Thr Leu Thr Glu Lys Met Glu His Arg Ser Val

705 710 715

ttgaagtcca ggaaatcaaa gcogaggcag ttgtgaacc caaagtggag aacaaaccca 2275

cctcctcaga attgcagaag atgcaagaga aacagaaact gagcacagag cccggctogg 2335

gagtgccgt gggtcicatt acaacccttc tggttattcc tgtgctggtc ctgctggcca 2395

ttgcatgtt tattcgttg aaaaaatcaa gggcctftgg agcagatcat gacgcaagc 2455

tcgagtcaag ttctggaaga gtctgggaa gaagaggagg aggaggagga agaagagaag 2515

gaagaggaag agaaggagga agaaaagcag aaggaggaag aagaggagaa ggaggaagat 2575

gaaggcagca ttagccatgg gcagggtctt gagaataagt agaaggggaa agggattggc 2635
 taagcaccga ttaaagctg tcagtccttt gggctgcaga tgcaatgtgg ctgcggaatt 2695
 ctcatgtttg acagcttatc atcgataagc ttggctgcag gtcaacttgt ttattgcagc 2755
 ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc 2815
 actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tct 2868

<210> 2
 <211> 715
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 2

Met Ala Gly Arg Ala Arg Ser Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
Leu Ala Leu Gln Ser Ser Cys Leu Ala Phe Arg Ser Pro Leu Ser Val
 20 25 30
Phe Lys Arg Phe Lys Glu Thr Thr Arg Ser Phe Ser Asn Glu Cys Leu
 35 40 45
Gly Thr Ile Gly Pro Val Thr Pro Leu Asp Ala Ser Asp Phe Ala Leu
 50 55 60
Asp Ile Arg Met Pro Gly Val Thr Pro Lys Glu Ser Asp Thr Tyr Phe
 65 70 75 80
Cys Met Ser Met Arg Leu Pro Val Asp Glu Glu Ala Phe Val Ile Asp
 85 90 95
Phe Lys Pro Arg Ala Ser Met Asp Thr Val His His Met Leu Leu Phe
 100 105 110
Gly Cys Asn Met Pro Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Trp Phe Cys Asp Glu
 115 120 125
Gly Thr Cys Thr Asp Lys Ala Asn Ile Leu Tyr Ala Trp Ala Arg Asn
 130 135 140
Ala Pro Pro Thr Arg Leu Pro Lys Gly Val Gly Phe Arg Val Gly Gly
 145 150 155 160

10

Glu Thr Gly Ser Lys Tyr Phe Val Leu Gln Val His Tyr Gly Asp Ile

165 170 175

Ser Ala Phe Arg Asp Asn His Lys Asp Cys Ser Gly Val Ser Val His

180 185 190

Leu Thr Arg Val Pro Gln Pro Leu Ile Ala Gly Met Tyr Leu Met Met

195 200 205

Ser Val Asp Thr Val Ile Pro Pro Gly Glu Lys Val Val Asn Ala Asp

210 215 220

Ile Ser Cys Gln Tyr Lys Met Tyr Pro Met His Val Phe Ala Tyr Arg

225 230 235 240

Val His Thr His His Leu Gly Lys Val Val Ser Gly Tyr Arg Val Arg

245 250 255

Asn Gly Gln Trp Thr Leu Ile Gly Arg Gln Asn Pro Gln Leu Pro Gln

260 265 270

Ala Phe Tyr Pro Val Glu His Pro Val Asp Val Thr Phe Gly Asp Ile

275 280 285

Leu Ala Ala Arg Cys Val Phe Thr Gly Glu Gly Arg Thr Glu Ala Thr

290 295 300

His Ile Gly Gly Thr Ser Ser Asp Glu Met Cys Asn Leu Tyr Ile Met

305 310 315 320

Tyr Tyr Met Glu Ala Lys Tyr Ala Leu Ser Phe Met Thr Cys Thr Lys

325 330 335

Asn Val Ala Pro Asp Met Phe Arg Thr Ile Pro Ala Glu Ala Asn Ile

340 345 350

Pro Ile Pro Val Lys Pro Asp Met Val Met Met His Gly His His Lys
 355 360 365

Glu Ala Glu Asn Lys Glu Lys Ser Ala Leu Met Gln Gln Pro Lys Gln
 370 375 380

Gly Glu Glu Glu Val Leu Glu Gln Asp Phe His Val Glu Glu Glu Leu
 385 390 395 400

Asp Trp Pro Gly Val Tyr Leu Leu Pro Gly Gln Val Ser Gly Val Ala
 405 410 415

Leu Asp Ser Lys Asn Asn Leu Val Ile Phe His Arg Gly Asp His Val
 420 425 430

Trp Asp Gly Asn Ser Phe Asp Ser Lys Phe Val Tyr Gln Gln Arg Gly
 435 440 445

Leu Gly Pro Ile Glu Glu Asp Thr Ile Leu Val Ile Asp Pro Asn Asn
 450 455 460

Ala Glu Ile Leu Gln Ser Ser Gly Lys Asn Leu Phe Tyr Leu Pro His
 465 470 475 480

Gly Leu Ser Ile Asp Thr Asp Gly Asn Tyr Trp Val Thr Asp Val Ala
 485 490 495

Leu His Gln Val Phe Lys Leu Asp Pro His Ser Lys Glu Gly Pro Leu
 500 505 510

Leu Ile Leu Gly Arg Ser Met Gln Pro Gly Ser Asp Gln Asn His Phe
 515 520 525

Cys Gln Pro Thr Asp Val Ala Val Glu Pro Ser Thr Gly Ala Val Phe
 530 535 540

Val Ser Asp Gly Tyr Cys Asn Ser Arg Ile Val Gln Phe Ser Pro Ser
 545 550 555 560

Gly Lys Phe Val Thr Gln Trp Gly Glu Glu Ser Ser Gly Ser Ser Pro
 565 570 575

Arg Pro Gly Gln Phe Ser Val Pro His Ser Leu Ala Leu Val Pro His
 580 585 590

Leu Asp Gln Leu Cys Val Ala Asp Arg Glu Asn Gly Arg Ile Gln Cys
 595 600 605

Phe Lys Thr Asp Thr Lys Glu Phe Val Arg Glu Ile Lys His Ala Ser
 610 615 620

Phe Gly Arg Asn Val Phe Ala Ile Ser Tyr Ile Pro Gly Phe Leu Phe
 625 630 635 640

Ala Val Asn Gly Lys Pro Tyr Phe Gly Asp Gln Glu Pro Val Gln Gly
 645 650 655

Phe Val Met Asn Phe Ser Ser Gly Glu Ile Ile Asp Val Phe Lys Pro
 660 665 670

Val Arg Lys His Phe Asp Met Pro His Asp Ile Val Ala Ser Glu Asp
 675 680 685

Gly Thr Val Tyr Ile Gly Asp Ala His Thr Asn Thr Val Trp Lys Phe
 690 695 700

Thr Leu Thr Glu Lys Met Glu His Arg Ser Val
 705 710 715

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular que tiene la designación del depósito de ATCC N° PTA-6784.
- 5 2. Uso de una línea celular que tiene la designación del depósito de ATCC N° PTA-6784 para expresar monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante.
3. Un método para la producción *in vitro* de un producto amidado, comprendiendo dicho método usar la línea celular con la designación de depósito de ATCC N° PTA-6784 para expresar monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante y
10 hacer reaccionar un precursor que tiene un resto de glicina, en forma de ácido libre y unido a un grupo carbonilo, en presencia de la monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante.
4. Un método para purificar una seleccionada de monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante y monooxigenasa peptidilglicina alfa-hidroxilante después de la expresión y secreción de las mismas al medio de cultivo, incluyendo
15 dicho método las etapas de:
 - (A) someter una muestra impura de monooxigenasa peptidilglicina alfa-amidante o monooxigenasa peptidilglicina alfa-hidroxilante, respectivamente, a cromatografía de intercambio aniónico en la que la elución es isocrática;
 - (B) someter el eluyente de la etapa (A) a cromatografía de interacción hidrófoba, en la que no se usa sulfato de amonio y en la que la elución es isocrática.
- 20 5. El método de la reivindicación 4 en el que se utiliza citrato sódico para facilitar la unión a columna en la etapa (B).

Figura 1 Mapa plasmídico de PHS1

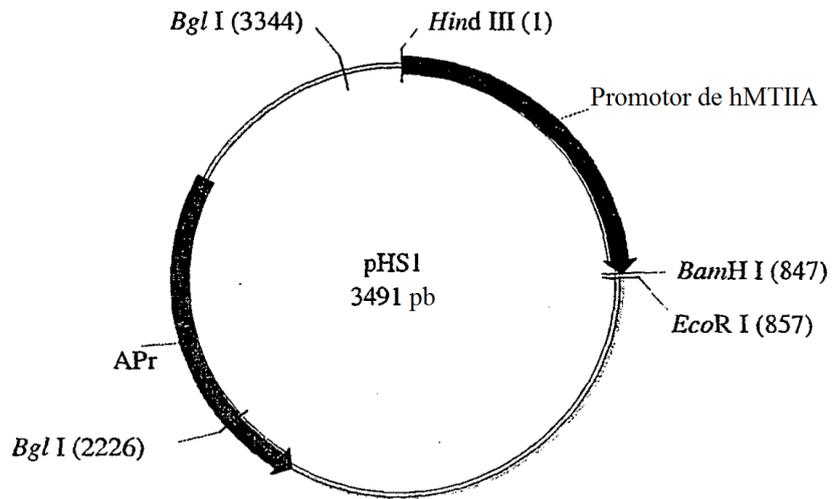


FIG. 1

Mapa Plasmídico de pUC8

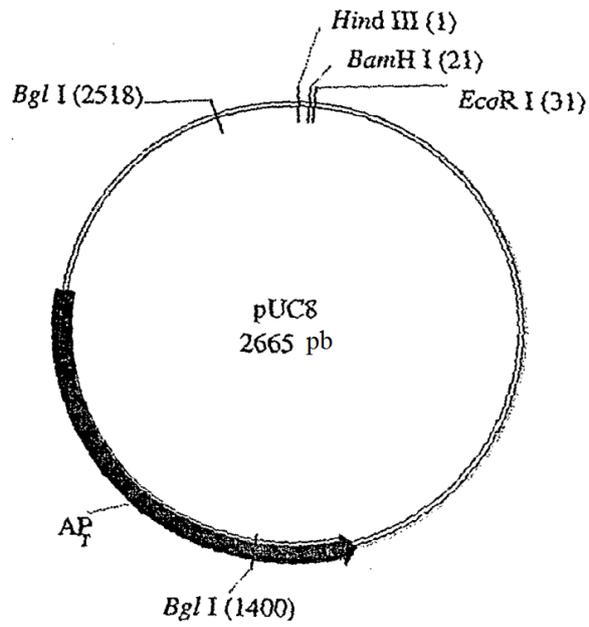


FIG. 2

Figura 3 Mapa Plasmídico de pSV402MT

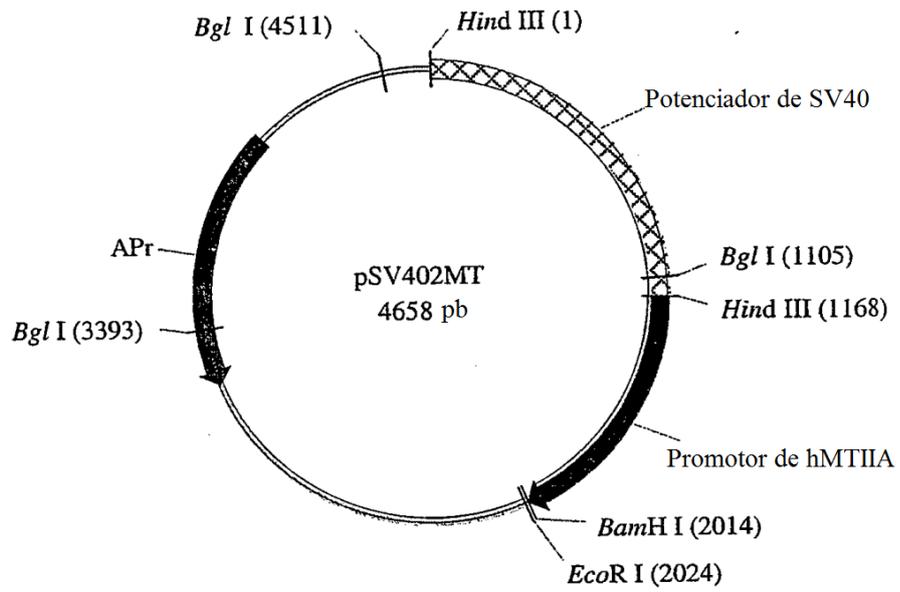


FIG. 3

Figura 4 Derivación de la Secuencia Génica de ADNc de α -AE

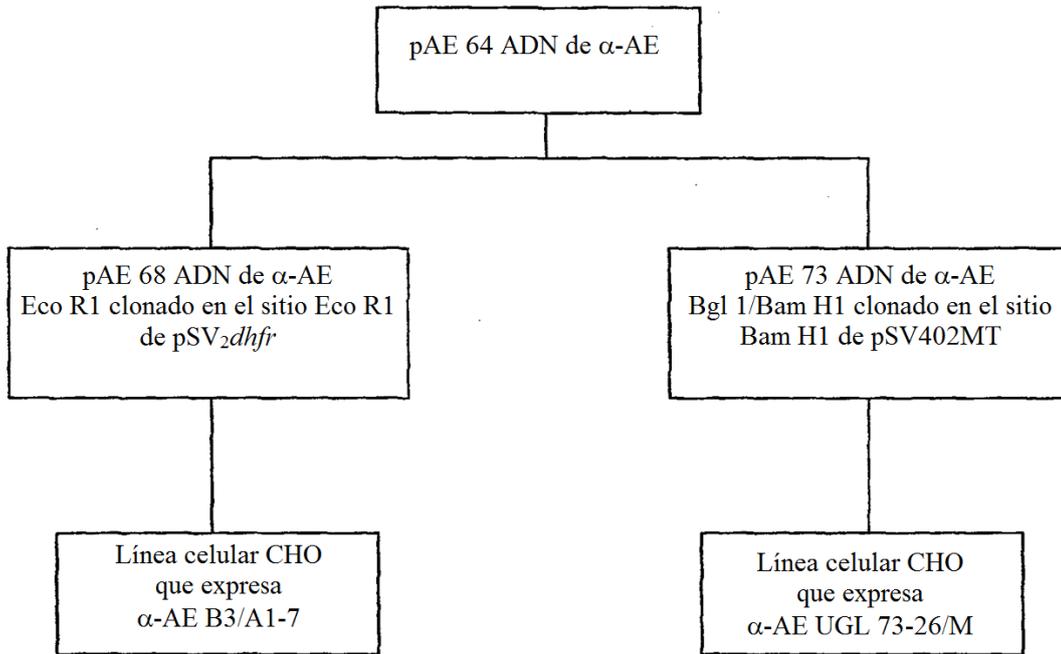


FIG. 4

Figura 5 Mapa Plasmídico de pAE73

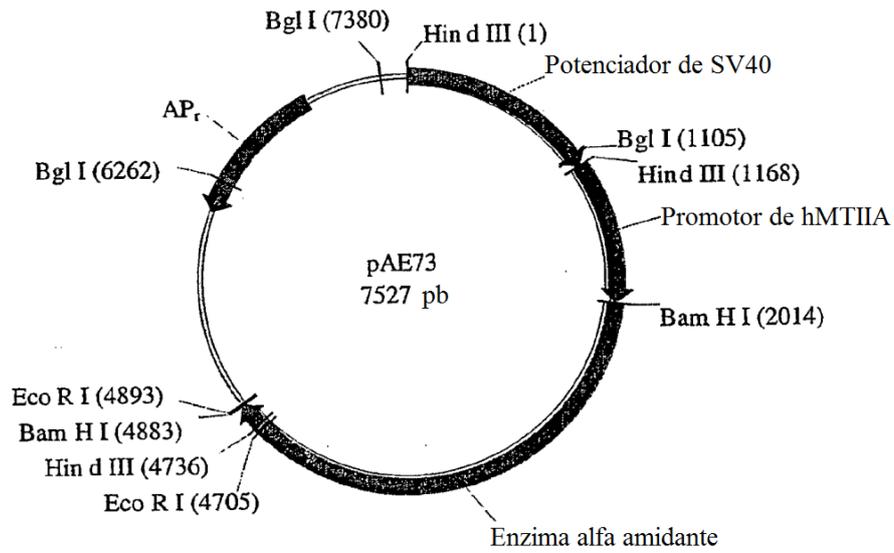


FIG. 5

Figura 6 Esquema de Adaptación de Suspensión 73-26

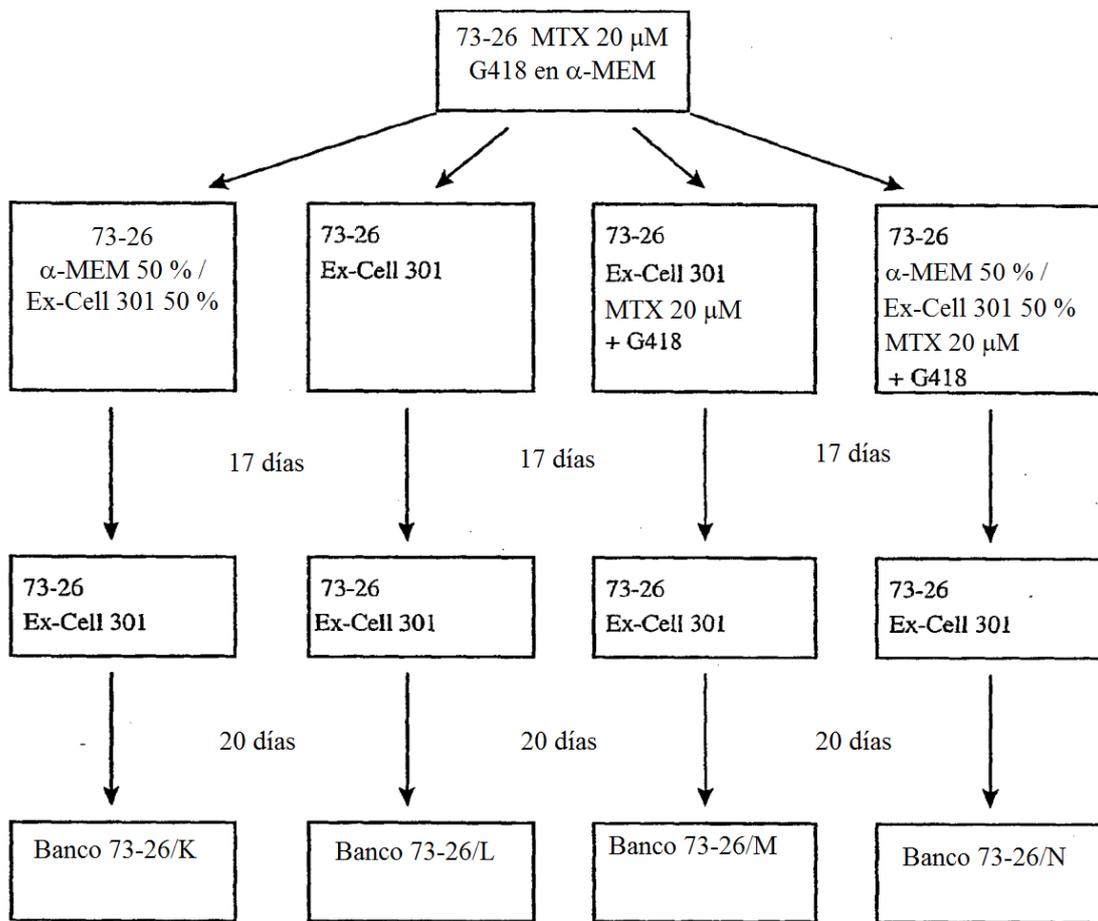


FIG. 6

Figura 7 Concentración de Oxígeno Disuelto y Productividad de α -AE en Matracas de Agitación

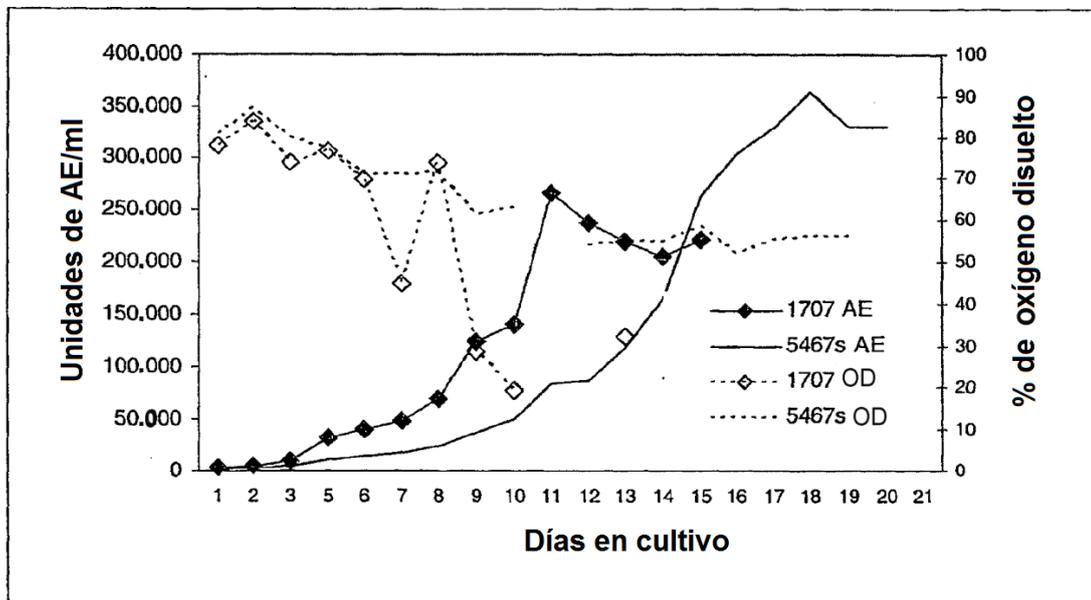


FIG. 7

Figura 8 Efecto del Volumen de Agitación en OD y la Productividad de α -AE

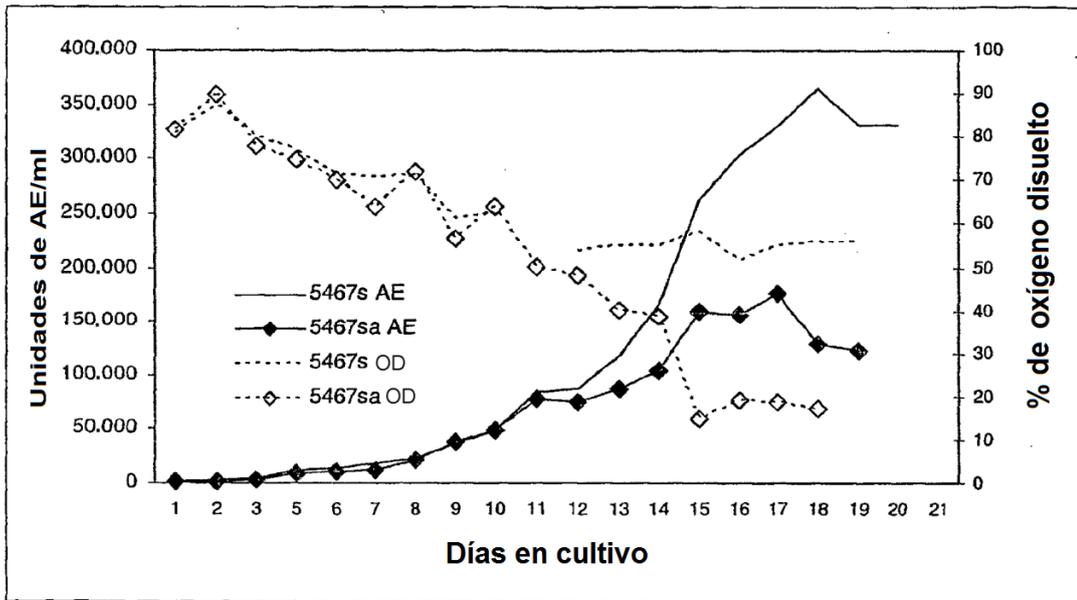


FIG. 8

Figura 9 pH del Cultivo de Agitación de UGL 73-26/M

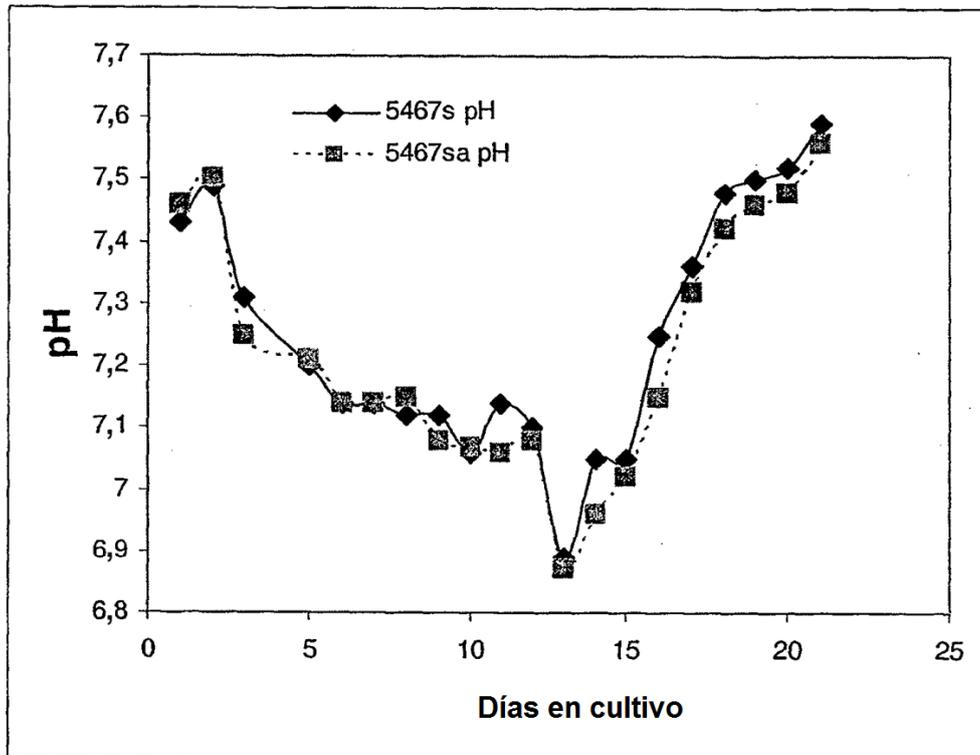


FIG. 9

Figura 10 Perfil de pH de Biorreactores de Tanque Agitado y Matrazes de Agitación sin Control de pH

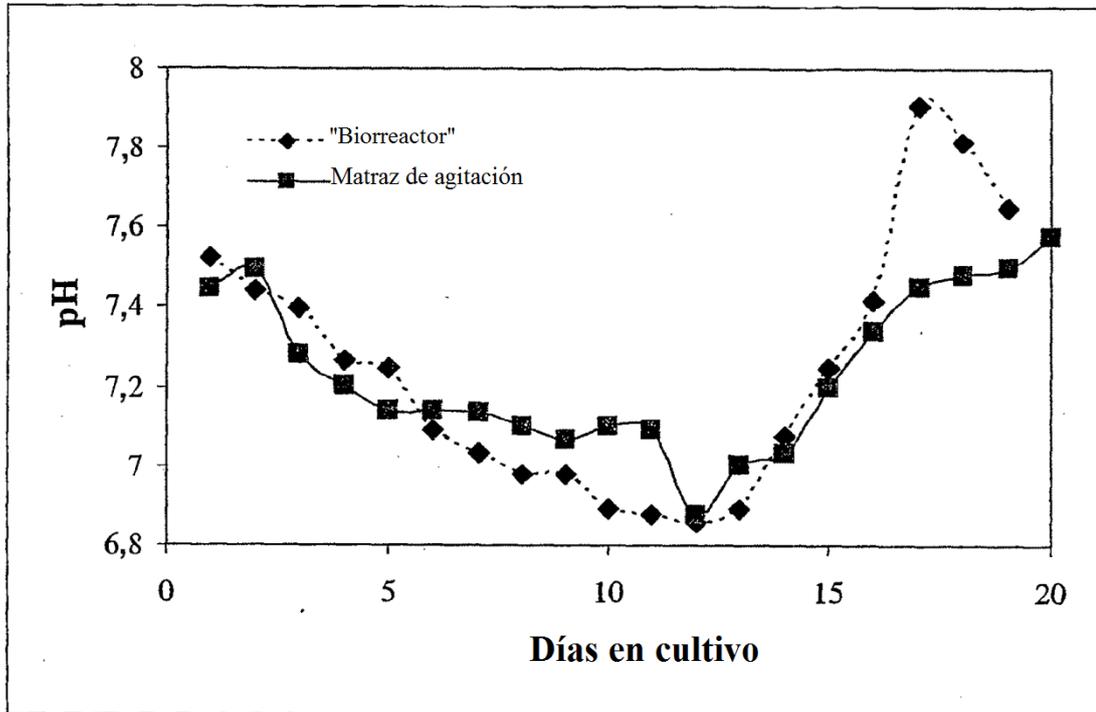


FIG. 10

Figura 11 Efecto del pH en la Productividad de α -AE de UGL 73-26/M en Biorreactores de Tanque Agitado

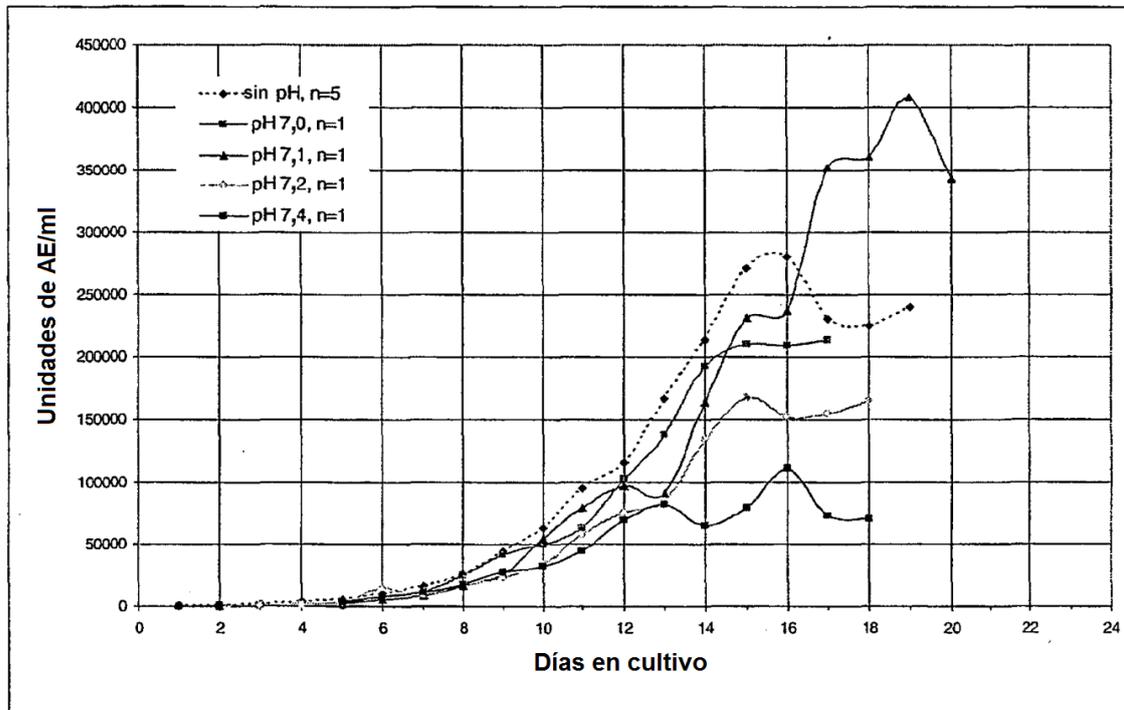


FIG. 11

Figura 12 SDS PAGE de Enzima PAM Purificada

Carril 1 - Patrón de referencia de α -AE, Carril 2 - Marcadores de Peso Molecular de Intervalo Amplio, Carril 3 - Recogido Clarificado, Carril 4 - Retenido de TFF 1, Carril 5 - Retenido de TFF 1, Carril 6 - Eluato de Q-Sepharose FF, Carril 7 - Eluato de Q-Sepharose FF, Carril 8 - Eluato de Fenil Sepharose FF, Carril 9 - Eluato de Fenil Sepharose, Carril 10 - Retenido de TFF 2.

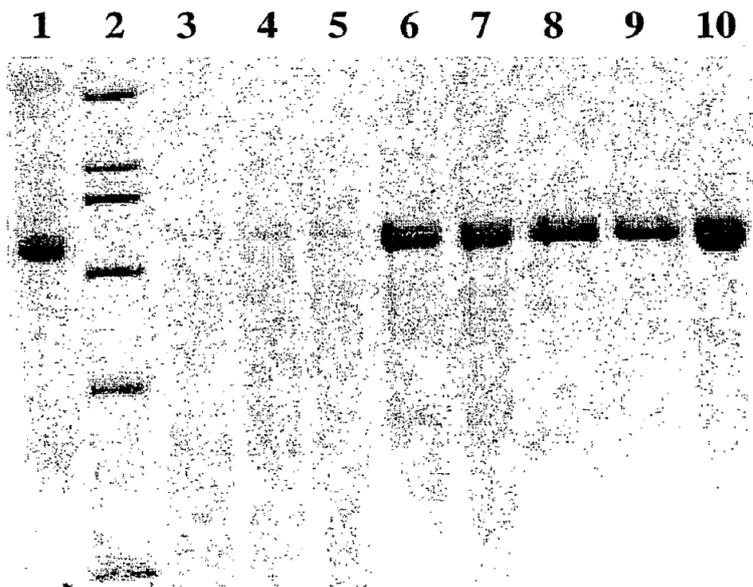


FIG. 12

Figura 13 Exploración Densitométrica de Gel de SDS PAGE y Cálculo de Porcentaje de Áreas de Pico

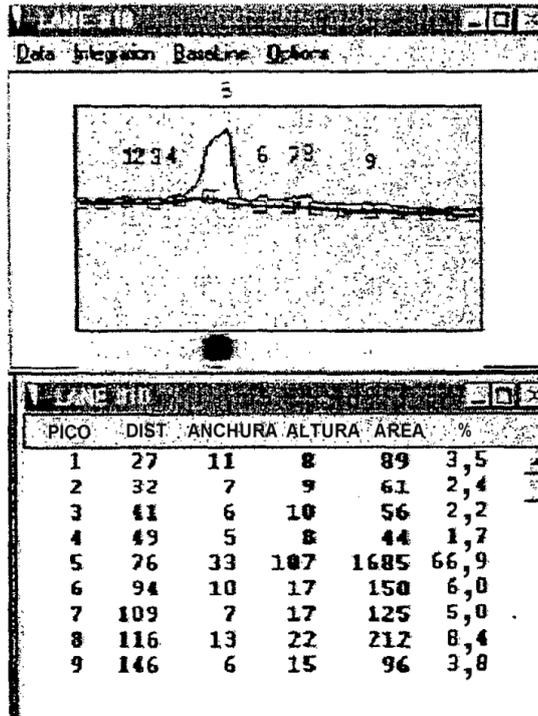


FIG.13

Figura 14 Diagrama de Flujo del Procedimiento para Producción de α -AE

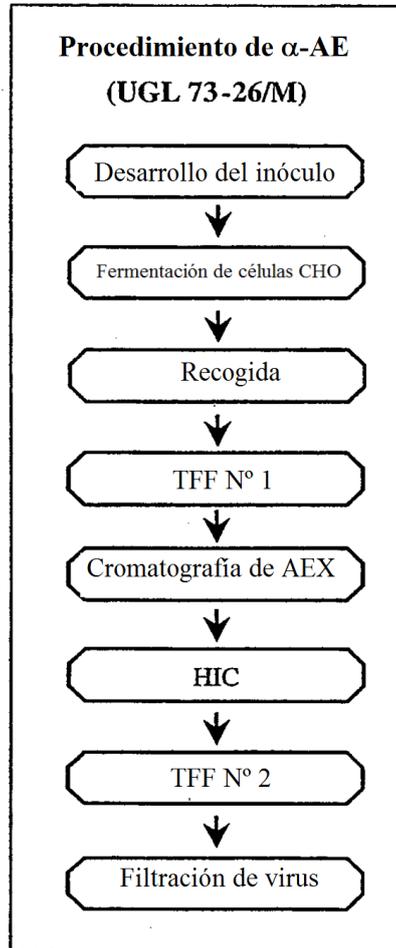


FIG. 14

Figura 15 Esquema de Inóculo para UGL 73-26/M

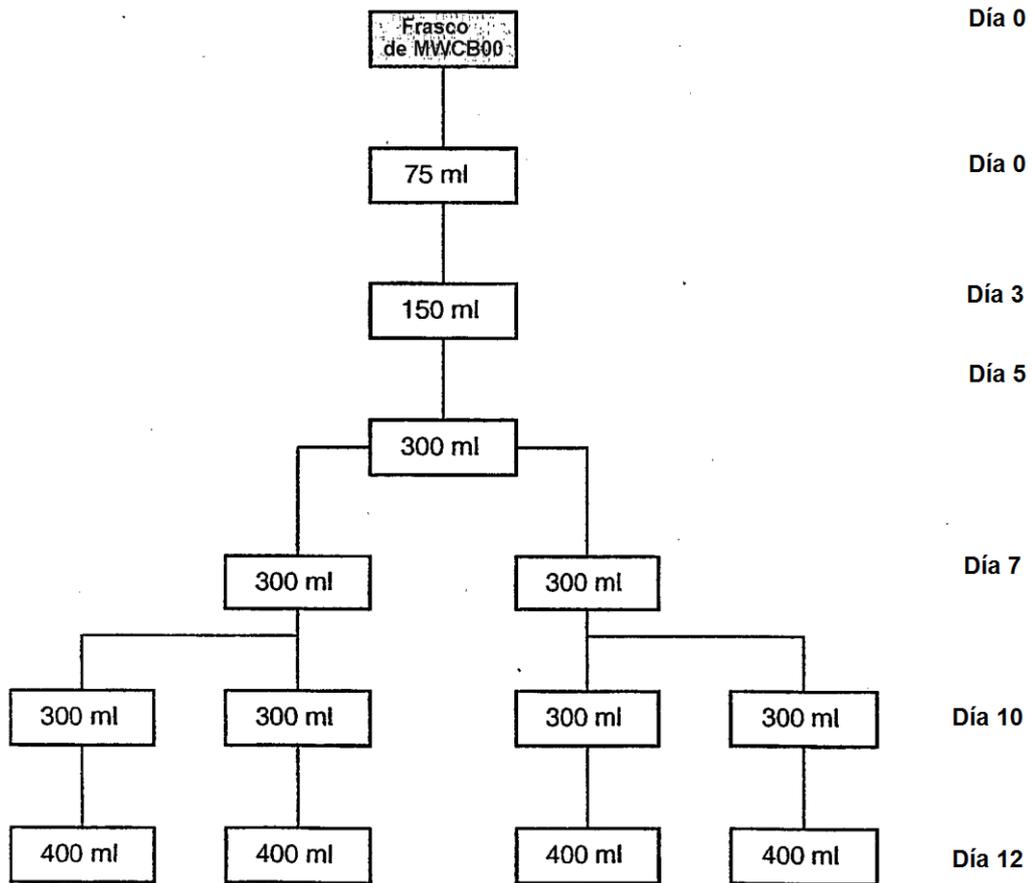


FIG. 15