

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 658**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 9/00** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C12N 1/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005 E 05734021 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1733039**

54 Título: **Células hospedadoras bacterianas mejoradas para la expresión directa de péptidos**

30 Prioridad:

**12.03.2004 US 552824 P**  
**09.03.2005 US 76260**

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

**29.01.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEHTA, NOZER M;**  
**CONSALVO, ANGELO P.;**  
**RAY, MARTHA V. L. y**  
**MEENAN, CHRISTOPHER P.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 440 658 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

Células hospedadoras bacterianas mejoradas para la expresión directa de péptidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la expresión directa de un producto peptídico en el medio de cultivo de células hospedadoras modificadas genéticamente que expresan el producto peptídico. Más particularmente, la divulgación se refiere a vectores de clonación, vectores de expresión, células hospedadoras y/o métodos de fermentación para producir un producto peptídico que se excreta al exterior del hospedador en el medio de cultivo con un alto rendimiento. En algunas realizaciones, la invención se refiere a la expresión directa de un producto peptídico que tiene glicina en el extremo C, que posteriormente se convierte en un péptido amidado que tiene un grupo amino en lugar de dicha glicina.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Existen varias técnicas para la producción recombinante de productos peptídicos, es decir cualquier compuesto cuya estructura molecular incluya una pluralidad de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Un problema cuando el producto peptídico extraño es pequeño es que a menudo es fácilmente degradable por las proteasas endógenas en el citoplasma o periplasma de la célula hospedadora que se utilizó para expresar el péptido. Otros problemas incluyen la consecución de una producción suficiente, y la recuperación del péptido en una forma relativamente pura sin alterar su estructura terciaria (lo que puede disminuir indeseablemente su capacidad para llevar a cabo su función básica). Para superar el problema del tamaño pequeño, la técnica anterior expresaba el producto peptídico de interés como una proteína de fusión con otro péptido (habitualmente más grande) y se acumulaba esta proteína de fusión en el citoplasma. El otro péptido puede cumplir varias funciones, por ejemplo, para proteger el péptido de interés de la exposición a las proteasas presentes en el citoplasma del hospedador. Un sistema de expresión tal se describe en Ray *et al.*, *Biol Technology*, Vol. 11, páginas 64-70, (1993).

Sin embargo, el aislamiento del producto peptídico utilizando una tecnología de este tipo requiere la escisión de la proteína de fusión y su purificación de entre todos los péptidos que se encuentran normalmente en el citoplasma del hospedador. Esto puede necesitar otras varias etapas que pueden disminuir la eficacia general del proceso. Por ejemplo, cuando una proteína de la técnica anterior se acumula en el citoplasma, las células habitualmente tienen que recogerse y destruirse, y los residuos celulares se tienen que eliminar en una etapa de clarificación. Todo esto se evita de acuerdo con la presente invención en la que el producto peptídico de interés se expresa directamente en, y se recupera de, el medio del cultivo.

En la técnica anterior a menudo es necesario el uso de una etapa de cromatografía de afinidad para purificar la proteína de fusión, la cual aún debe someterse a la escisión para separar el péptido de interés de su compañero de fusión. Por ejemplo, en el artículo *Biol Technology* identificado anteriormente, el precursor de la calcitonina de salmón se escindía de su compañero de fusión utilizando bromuro de cianógeno. Esa etapa de escisión necesita aún otras etapas adicionales para proteger los grupos sulfhidrilos de cisteína en las posiciones 1 y 7 del precursor de la calcitonina de salmón. Se ha utilizado la sulfonación para proporcionar grupos de protección a las cisteínas. Esto a su vez alteraba la estructura terciaria del precursor de la calcitonina de salmón lo que necesitaba una renaturalización posterior del precursor (y por supuesto la eliminación de los grupos de protección).

El producto peptídico se expresa solo con una señal de secuencia y no se expresa con un gran compañero de fusión. La presente invención da como resultado una "expresión directa". Se expresa inicialmente con una región de señal unida en el lado de su extremo N. Sin embargo, esta región de señal se escinde de manera post-traducciona durante la *secreción* del producto peptídico en el periplasma de la célula. Posteriormente, el producto peptídico se difunde o bien se *excreta* desde el periplasma al medio de cultivo en el exterior de la célula, donde puede recuperarse en su forma terciaria apropiada. No se une a ningún compañero de fusión cuya eliminación puede requerir primero la destrucción celular por desnaturalización o modificación, aunque en algunas realizaciones de la divulgación, se utiliza la sulfonación para proteger los grupos sulfhidrilos de la cisteína durante la purificación del producto peptídico.

Otro problema con la acumulación del producto peptídico en el interior de la célula de la técnica anterior, es que el producto que se acumula puede ser tóxico para la célula y puede por tanto limitar la cantidad de proteína de fusión que se puede sintetizar. Otro problema con esta estrategia es que el compañero de fusión más grande habitualmente constituye la mayoría del rendimiento. Por ejemplo, el 90 % del rendimiento de la producción puede ser el compañero de fusión mayor, dando como resultado de este modo que solo el 10 % del rendimiento corresponda al péptido de interés. Otro problema más con esta estrategia es que la proteína de fusión puede formar cuerpos de inclusión insolubles en la célula, y la solubilización de los cuerpos de inclusión seguida por la escisión puede que no produzca péptidos biológicamente activos.

La técnica anterior intentaba expresar el péptido junto con un péptido señal anclado al extremo N para dirigir el producto peptídico deseado para que se secrete al periplasma (véase, EP 177.343, Genentech Inc.). Se han

identificado varios péptidos señal (véase Watson, M. Nucleic Acids Research, Vol. 12, Nº 13, pp: 5145- 5164). Por ejemplo, Hsiung *et al.* (Biotechnology, Vol 4, Noviembre 1986, pp: 991- 995) utilizaron el péptido señal de la proteína A de membrana externa (OmpA) de *E. coli* para dirigir ciertos péptidos al periplasma. La mayoría de las veces, los péptidos segregados al periplasma tienden frecuentemente a permanecer ahí con una excreción mínima al medio.

5 Se puede necesitar una etapa más no deseable para alterar o permeabilizar la membrana externa para liberar suficientes cantidades de los componentes periplasmáticos. Algunos intentos de la técnica anterior para excretar los péptidos del periplasma al medio de cultivo en el exterior de la célula incluyeron poner en peligro la integridad de la barrera de la membrana externa haciendo que el hospedador expresara simultáneamente el producto peptídico deseado que contenía un péptido señal junto con una proteína lítica de péptidos que producía que la membrana

10 externa se convirtiera en permeable o que tuviera fugas (Patente de Estados Unidos Nº 4.595.658). Sin embargo, es necesario tener cuidado con la cantidad de proteína lítica de péptidos producida para no poner en peligro la integridad celular y destruir las células. La purificación del péptido de interés también se puede hacer más difícil con esta técnica.

15 Aparte de las técnicas de desestabilización de la membrana externa descritas anteriormente, hay medios menos estrictos para permeabilizar la membrana externa de bacterias gram negativas. Estos métodos no producen necesariamente la destrucción de la membrana externa lo que puede conducir a una viabilidad celular menor. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el uso de agentes catiónicos (Martti Vaara, Microbiological Reviews, Vol. 56, páginas 395-411 (1992)) y glicina (Kaderbhai *et al.*, Biotech. Appl. Biochem, Vol. 25, páginas 53-61 (1997)). Los

20 agentes catiónicos permeabilizan la membrana externa interaccionando con y causando un daño a la estructura de lipopolisacáridos de la membrana externa. La cantidad de daño y alteración puede ser no letal o letal dependiendo de la concentración utilizada. La glicina puede reemplazar los restos de alanina en el péptido componente de los peptidoglicanos. El peptidoglicano es uno de los componentes estructurales de la pared celular externa de las bacterias gram negativas. Cultivando *E. coli* en altas concentraciones de glicina se aumenta la frecuencia de

25 reemplazos de alanina por glicina dando como resultado una pared celular con defectos, y por tanto con un aumento de la permeabilidad.

Otro método de la técnica anterior para causar la excreción de un producto peptídico deseado conlleva la fusión del producto a una proteína transportadora que se excreta normalmente al medio (hemolisina) o una proteína entera expresada en la membrana externa (por ejemplo, la proteína ompF). Por ejemplo, la endorfina  $\beta$  humana puede excretarse como una proteína de fusión por las células de *E. coli* cuando se une a un fragmento de la proteína ompF (EMBO J., Vol 4, Nº 13A, pp: 3589-3592, 1987). Sin embargo, el aislamiento del producto peptídico deseado es difícil, debido a que tiene que separarse del péptido transportador, e implica algunas (aunque no todas) las

30 desventajas asociadas con la expresión de los péptidos de fusión en el citoplasma.

Otra estrategia más de la técnica anterior altera genéticamente una célula hospedadora para crear nuevas cepas que tienen una membrana externa permeable, que es relativamente incapaz de retener cualquier péptido o proteína periplasmática. Sin embargo, estas nuevas cepas pueden ser difíciles de mantener y pueden necesitar condiciones estrictas que afectan adversamente al rendimiento del producto peptídico deseado.

35

Raymond Wong *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 5.223.407) concibieron otra estrategia más para la excreción de los productos peptídicos produciendo una construcción de ADN recombinante que comprende ADN que codifica la proteína heteróloga acoplada en el marco de lectura con el ADN que codifica un péptido señal ompA y una región de control que comprende un promotor tac. Este sistema produce rendimientos significativamente menores que los que se alcanzan utilizando la presente invención.

40

45

Aunque la técnica anterior permite que las proteínas se exporten del periplasma al medio, esto da lugar a células poco saludables que no pueden cultivarse fácilmente en las altas densidades que se desean, afectando por lo tanto negativamente al rendimiento del producto.

50

Más recientemente, Mehta *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 6.210.925) han desvelado sistemas de expresión para la expresión directa de los productos peptídicos en el medio de cultivo en el que se cultivan células hospedadoras modificadas genéticamente. Se consiguieron altos rendimientos con nuevos vectores, una selección especial de hospedadores, y/o procesos de fermentación que incluyen el control cuidadoso de la tasa de crecimiento celular, y el uso de un inductor durante la fase de crecimiento. Se proporcionan vectores especiales que incluyen regiones de control que tienen múltiples promotores unidos operativamente con las regiones codificantes que codifican un péptido señal corriente arriba de una región codificante que codifica el péptido de interés. También se utilizan múltiples casetes de transcripción para aumentar el rendimiento.

55

El documento de la técnica anterior BANEYX F *et al.*: "Construction and characterization of Escherichia coli strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo." JOURNAL OF BACTERIOLOGY ABR 1991, vol. 173, nº. 8, Abril 1991 (1991-04), páginas 2696-2703, describe la construcción de células hospedadoras modificadas que tienen una delección de proteasa III. La Patente de Estados Unidos Nº US 6103495 describe células hospedadoras que tienen una delección rec A.

60

La presente invención pretende producir un péptido con mayores rendimientos con un vector de expresión eficaz utilizando nuevas células hospedadoras modificadas genéticamente. La presente divulgación también pretende producir vectores de expresión eficaces utilizando nuevos vectores de clonación universales.

## 5 Sumario de la invención

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención hacer que se acumule un producto peptídico con un buen rendimiento en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras que producen el péptido. Esto es ventajoso porque el medio está relativamente libre de muchos péptidos celulares contaminantes.

Es otro objetivo de la invención proporcionar células hospedadoras modificadas genéticamente que son particularmente útiles en la expresión de los nuevos vectores de expresión de la divulgación y en la acumulación de producto peptídico con buen rendimiento en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras que producen el péptido.

Es otro objetivo de la invención proporcionar un proceso mejorado de fermentación para aumentar el rendimiento de un producto peptídico expresado por células hospedadoras modificadas genéticamente.

Es un objetivo más de la invención proporcionar métodos mejorados para la producción de péptidos amidados utilizando péptidos precursores que tienen glicinas en el extremo C, dichos precursores se amidan a continuación de la expresión directa en el medio de cultivo de acuerdo con la invención.

En consecuencia, la presente invención proporciona una bacteria *E. coli* modificada genéticamente deficiente en los genes cromosómicos *rec A* y *ptr* que codifican la proteína de recombinación A y la Proteasa III, respectivamente.

La presente divulgación también proporciona un vector de clonación que comprende: (a) una región de control que comprende al menos dos promotores; (b) ácidos nucleicos que codifican una secuencia de señal; (c) dos sitios de restricción enzimática de clonación de genes que permiten la clonación de un gen que codifica un péptido en el marco de lectura con dicha secuencia de señal y unido operativamente con dicha región de control; (d) al menos dos sitios de restricción enzimática de clonación en el casete 3' de dichos sitios de restricción enzimática de clonación de genes; y (e) al menos dos sitios de restricción enzimática de clonación en el casete 5' de dicha región de control, en el que todos dichos sitios de restricción enzimática son diferentes unos de otros y únicos en dicho vector.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora *E. coli* deficiente en genes cromosómicos *rec A* y *ptr* que codifican la recombinación de proteína A y Proteasa III, respectivamente, conteniendo y expresando dicho hospedador un vector de expresión que comprende una pluralidad de casetes de transcripción en tándem, comprendiendo cada casete: (1) una región codificante con ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico acoplados en el marco de lectura 3' de ácidos nucleicos que codifican un péptido señal; y (2) una región de control unida operativamente con la región codificante, comprendiendo dicha región de control una pluralidad de promotores.

La presente invención además proporciona un método de producción de un producto peptídico que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la presente invención transformada o transfectada con el vector de expresión en un medio de cultivo y luego la recuperación del producto peptídico del medio en el que la célula hospedadora se ha cultivado.

La presente invención también proporciona un método de producción de un producto peptídico amidado que comprende las etapas de: (a) el cultivo de la célula hospedadora de la presente invención transformada o transfectada con el vector de expresión en un medio de cultivo, en el que el producto peptídico incluye una glicina en el extremo C; (b) la recuperación de dicho producto peptídico de dicho medio de cultivo; y (c) la conversión de dicho producto peptídico en un péptido amidado convirtiendo dicha glicina del extremo C en un grupo amino.

## Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran un diagrama esquemático de la construcción del vector pUSEC-03 (1A) que se utiliza en la construcción del vector pUSEC-05 (1B) que a su vez se utiliza en la construcción del vector pUSEC-05IQ (1C) (Número de registro ATCC PTA-5567).

Las Figuras 2A y 2B muestran un diagrama esquemático de la construcción del vector pCPM-00 (2A) que se usa en la construcción del vector pUSEC-06 (2B) (Número de registro ATCC PTA-5568).

Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran un diagrama esquemático de la unión de un péptido genérico denominado péptido X en el vector de expresión de la secreción pUSEC-05IQ (3A) para generar el vector pPEPX-01 que se utiliza junto con el vector pUSEC-06 para construir un vector monogénico de producción pPEPX-02 (3B) que se utiliza para construir un vector digénico de producción pPEPX-03.

La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de la construcción del vector pSCT-038. El pSCT-038 se utilizó para transformar la *E. coli* BLR y BLM-6 y producir los clones digénicos UGL 703 y UGL801, respectivamente.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención permite rendimientos de producto peptídico de más de 100 mg por litro de medio. Esto se logra con nuevos hospedadores (que se transforman, transfectan o utilizan de acuerdo con la invención), nuevos procesos de fermentación, o una combinación de dos o más de los anteriores.

#### Célula hospedadora

La presente invención proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con cualquiera de los vectores. La célula hospedadora es un bacteria *E. coli* modificada genéticamente deficiente en los genes cromosómicos *rec A* y *ptr* que codifican la proteína de recombinación *A* y la Proteasa III, respectivamente.

Preferentemente, la bacteria *E. coli* modificada genéticamente es de la cepa BLR que ya es deficiente en el gen cromosómico *rec A*. Más preferentemente, la célula hospedadora de la presente invención es una cepa BLR mutante BLM6 que tiene el número de registro ATCC PTA-5500.

#### Visión de conjunto de los Vectores de Clonación Universales Preferidos

La presente divulgación también proporciona vectores de clonación universales que permiten la construcción simple de vectores de expresión tales como el vector de expresión preferido desvelado que se indica posteriormente.

#### Vector pUSEC-05IQ

Un vector de clonación universal preferido es el plásmido pUSEC-05IQ que está diseñado para la clonación de genes que codifican péptidos. El vector pUSEC-05IQ (Figura 3C) contiene el bloque promotor doble *tac* y *lac* seguido por la secuencia de señal *ompA*. Directamente adyacente a la secuencia de señal están los sitios únicos de restricción *Stu I* y *Nco I* que permiten la clonación de genes que codifican péptidos en fase con la secuencia de señal. Corriente abajo del sitio de clonación múltiple se encuentra el terminador de transcripción doble *mB T<sub>1</sub> T<sub>2</sub>*. El vector también transporta una copia del gen codificante del represor *LacI<sup>Q</sup>* para la regulación de los promotores *tac* y *lac*. El plásmido lleva el gen de resistencia a la ampicilina para la selección. El vector se ha construido utilizando el pSP72 como el plásmido de base, el cual lleva el origen de replicación de *pUC*. El casete de expresión, que contiene los promotores dobles, la señal *ompA*, el gen del péptido clonado y los terminadores de transcripción, puede cortarse del vector utilizando tres sitios de restricción únicos situados corriente arriba y corriente abajo del casete.

La utilidad de este vector tiene dos componentes. El primer componente de utilidad es en el uso de este vector como un vector de expresión universal para la secreción de polipéptidos heterólogos. Utilizando los sitios de clonación unidos en fase con la secuencia de señal *ompA* se puede clonar y expresar cualquier gen heterólogo como un producto segregado. Esta función se podría utilizar para la exploración rápida de dianas genéticas potenciales sin la necesidad de lisar las células para buscar la expresión. Esta utilidad se basa en la función deseada de clonación y expresión de péptidos que se expresan, segregan y transportan por difusión al medio de cultivo. El segundo componente de utilidad reside en el uso de los seis sitios de restricción que se utilizan para la escisión del casete de expresión. Estos sitios se utilizan en combinación con un segundo vector para la clonación de múltiples copias del casete de expresión para obtener niveles aumentados de expresión.

#### Vector pUSEC-06

Otro vector de clonación universal preferido es el plásmido pUSEC-06 que actúa como un vector de producción que mejora la secreción para la clonación de hasta tres copias del casete de expresión clonado en el pUSEC-05IQ. El vector pUSEC-06 que se muestra en la Figura 2 contiene los mismos seis sitios de restricción únicos flanqueando el casete de expresión que se encuentran en el pUSEC-05IQ. Los seis sitios están agrupados en tres pares que se pueden utilizar para clonar individualmente copias separadas de los casetes de expresión. El vector contiene los genes que codifican los factores de secreción *SecE* y *prlA-4* (un alelo mutante de *SecY*). El promotor *lac* controla la expresión del gen *SecE* y el promotor *trpA* controla la expresión del gen *prlA-4*. Los terminadores de transcripción en tándem *mB T<sub>1</sub> T<sub>2</sub>* se localizan corriente abajo de los genes *SecE* y *prlA-4*. El plásmido lleva una copia del represor *LacI<sup>Q</sup>* para la regulación de los promotores que utiliza las secuencias del operador *lac*. El gen de resistencia a la kanamicina se codifica en el vector para la selección. Como para el pUSEC-05IQ el vector de base del pUSEC-06 fue el pSP72 que lleva el origen *pUC* de replicación.

Como con el pUSEC-05IQ la utilidad del pUSEC-06 tiene dos componentes. El vector pUSEC-06 actúa como un vehículo de la producción para aumentar la expresión de las proteínas secretadas. La presencia de los genes *SecE* y *prlA-4* amplifica la tasa de secreción aumentando dos de los componentes integrales de la maquinaria *Sec*. Los genes *SecE* y *SecY* (*prlA*) forman el domino de translocación para la secreción de proteínas, por tanto aumentando el nivel de estos dos factores se aumenta el número de dominios de translocación. Con un aumento de la capacidad de translocación, las proteínas sobre expresadas seleccionadas para secreción se pueden secretar a través de la membrana periplasmática con mayor eficacia. El resultado final es una mayor acumulación y recuperación del péptido procesado del medio de cultivo acondicionado.

La segunda utilidad se refiere al pUSEC-05IQ. Los seis sitios únicos de restricción tanto en pUSEC-05IQ como en pUSEC-06 forman la base para la clonación de múltiples casetes de expresión. Con la metodología descrita en el esquema adjunto se pueden clonar hasta tres copias del casete de expresión creando clones de expresión mono, di y trigénicos. El esquema representa la clonación completa de un péptido por medio de la creación de un vector de expresión digénico. Este nuevo método para aumentar la dosificación genética en un vector se podría aplicar también a otros sistemas de expresión.

En la Tabla 1 se da una lista de todos los componentes genéticos de pUSEC-05IQ y pUSEC-06.

**Tabla 1 - componentes genético de pUSEC-05IQ y pUSEC-06**

Componentes del vector	Tipo de componente	Origen o molde
Promotor Tac	Bloque de ADN	Pharmacia Biosciences
Gen de resistencia a la kanamicina	Bloque génico	Pharmacia Biosciences
Gen de resistencia a la ampicilina	Codificado en el Plásmido	PSP72
RRNB T1-T2	Fragmento PCR	Terminadores de la transcripción del gen de proteína ribosómica T1 y T2 de pKK 233-2
Represor Lac (Lac <sup>l</sup> )	Gen amplificado por PCR	Plásmido pGEX 1-N
Operador / promotor Lac	Fragmento amplificado por PCR	pGEM11ZF+
Secuencia de señal ompA	Producto amplificado por PCR	pIN IIIA
SEC E	Gen amplificado por PCR	ADN genómico de <i>E. coli</i> WA 837
PRLA-4*	Gen amplificado por PCR	Vector pRLA41
TRP P/O	Gen de oligonucleótido sintético ensamblado	Promotor / operador del triptófano E de <i>E. coli</i> Secuencia de la bibliografía
* El gen PRLA-4 es un alelo mutante del gen prlA (SecY).		

10

Visión de conjunto de un vector de expresión preferido

15

La presente divulgación además proporciona un vector de expresión que comprende una región codificante y una región de control que puede construirse fácilmente utilizando los vectores de clonación universales preferidos anteriores (Figuras 3A-3C). La región codificante comprende ácidos nucleicos para un producto peptídico de interés acoplados en marco de lectura corriente abajo de los ácidos nucleicos que codifican un péptido señal. La región de control está unida operativamente a la región codificante y comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión al ribosoma, en el que al menos uno de los promotores se selecciona de entre el grupo que consiste en tac y lac.

20

Preferentemente, el vector comprende una pluralidad de casetes de transcripción situados en tándem, teniendo cada casete la región de control y la región codificante de la presente invención. Se cree que tal vector digénico o vector multigénico proporciona una expresión mejor que lo haría un vector de expresión dicistrónico o multicistrónico. Esto es una mejora sorprendente sobre la expresión dicistrónica o multicistrónica que no se cree que se haya sugerido en la técnica anterior.

25

30

El vector puede además opcionalmente comprender ácidos nucleicos que codifiquen un péptido represor que reprima los operadores asociados con uno o más de los promotores en la región de control, una región de terminador de la transcripción, una región marcadora seleccionable y/o una región que codifique al menos un péptido de secreción mejorada. De manera alternativa, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican un péptido represor y un péptido de secreción mejorada pueden estar presentes en un vector separado coexpresado en la misma célula hospedadora que el vector que expresa el producto peptídico.

35

Se exponen en el presente documento ejemplos específicos de vectores de expresión contruidos, y métodos para construir tales vectores de expresión. Se pueden utilizar muchos vectores disponibles comercialmente como vectores de partida para los vectores preferidos de la invención. Algunas de las regiones preferidas de los vectores de la invención pueden estar ya incluidas en el vector de partida de forma que el número de modificaciones necesarias para obtener el vector de la invención es relativamente modesto. Los vectores de partida preferidos incluyen pero no se limitan a pSP72 y pKK233-2. Sin embargo, los vectores de partida más preferidos son los vectores de clonación que incluyen los vectores de clonación universales de expresión directa pUSEC-05IQ y pUSEC-06 como se describe posteriormente en el presente documento.

40

45

Se cree que los nuevos vectores proporcionan ventajas que son inherentes a los vectores, y que esas ventajas inesperadas estarán presentes incluso si los vectores se utilizan en células hospedadoras distintas a los hospedadores particulares identificados como particularmente útiles en el presente documento, y sin tener en cuenta si se ha utilizado el proceso mejorado de fermentación descrito en el presente documento.

Se cree que el nuevo proceso de fermentación proporciona un rendimiento aumentado debido a las ventajas inherentes al proceso de fermentación. Se cree que estas ventajas son aparentes particularmente cuando se utilizan las células hospedadoras preferidas y/o los nuevos vectores descritos en el presente documento.

- 5 No obstante lo anterior, una realización preferida de la invención utiliza simultáneamente los vectores de expresión mejorados transformados en las células hospedadoras identificadas particularmente de la invención y expresados utilizando la invención de la fermentación preferida descrita en el presente documento. Cuando los tres se utilizan en combinación, se cree que se puede alcanzar un aumento significativo del rendimiento y de la recuperación del producto con respecto a la técnica anterior.

10

La región de control

- 15 La región de control está unida operativamente a la región codificante y comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión al ribosoma, en la que al menos uno de los promotores se selecciona de entre el grupo que consiste en lac y tac. Se ha descubierto sorprendentemente que la anterior combinación de promotores en una única región de control aumenta significativamente el rendimiento del producto peptídico producido por la región codificante (como se describe con mayor detalle en el presente documento). Se esperaba que tales dos promotores proporcionaran sobre todo una función redundante, y no que proporcionaran un efecto aditivo o sinérgico cualquiera. Los experimentos llevados a cabo por los solicitantes han demostrado sorprendentemente una sinergia al utilizar la combinación de promotores reivindicada. Se conocen otros promotores en la técnica, y se pueden utilizar en combinación con promotores tac o lac de acuerdo con la invención. Tales promotores incluyen, aunque sin limitación, lpp, ara B, trpE, galk.

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

30 La región codificante

- 35 La región codificante comprende ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico de interés acoplados en marco de lectura corriente abajo de los ácidos nucleicos que codifican un péptido señal por lo que la región codificante codifica un péptido que comprende respectivamente, del extremo N al extremo C la señal y el producto peptídico. Sin la intención de quedar ligados por teoría alguna, se cree que la señal puede proporcionar alguna protección al producto peptídico frente a la degradación proteolítica además de participar en su secreción al periplasma.

- 40 Se conocen muchas secuencias de péptidos de señal y pueden utilizarse de acuerdo con la invención. Estas incluyen secuencias de señal de proteínas de membrana externa de células hospedadoras bien caracterizadas, y cualquier secuencia capaz de translocar el producto peptídico al periplasma y de ser escindida post traduccionalmente por el hospedador como resultado de la translocación. Los péptidos de señal útiles incluyen pero sin limitación OmpA, pel B, Omp C, Omp F, Omp T,  $\beta$ -1a, Pho A, Pho S y Staph A.

- 45 El producto peptídico preferentemente es lo suficientemente pequeño para que, sin la presente invención, necesitara habitualmente un compañero de fusión utilizando tecnología de la técnica anterior. Normalmente, el producto peptídico tiene un peso molecular de menos de 10 KDa. Más preferentemente, el producto peptídico tiene una glicina en el extremo C, y se utiliza como precursor para una reacción de amidación enzimática que convierte la glicina del extremo C en un grupo amino, dando como resultado así un péptido amidado. Tal conversión se describe con más detalle posteriormente. Muchos péptidos hormonales y neurotransmisores biológicamente importantes son péptidos amidados de este tipo. Por ejemplo, el producto peptídico codificado por la región codificante puede ser el precursor de la calcitonina de salmón o el precursor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, teniendo ambos glicinas en el extremo C y pudiendo ambos ser amidados enzimáticamente a calcitonina madura de salmón o péptido maduro relacionado con el gen de la calcitonina. Otros péptidos amidados que se pueden producir de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, factor de liberación de la hormona de crecimiento, péptido intestinal vasoactivo y galanina. Otros péptidos amidados se conocen bien en la técnica.

- 50 Se podrían producir también análogos de la hormona paratiroidea de acuerdo con la invención. Por ejemplo, un péptido que tenga los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea puede proporcionar una función similar a la de la hormona paratiroidea en sí misma, al igual que puede hacerlo una versión amidada del análogo de 34 aminoácidos. Este último puede producirse expresando, de acuerdo con uno o más de los sistemas y métodos de expresión descritos en el presente documento, los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea, seguidos por glicina-35. La amidación enzimática como se desvela en el presente documento podría convertir entonces la glicina en un grupo amino. También se prefieren otros análogos de la hormona paratiroidea, tales como los análogos de la hormona paratiroidea humana PTH 1-30 y la PTH 1-31, en forma tanto amidada como no amidada.

65

Aunque las realizaciones preferidas del sistema de expresión directa descrito en el presente documento produce péptidos que tienen glicina en el extremo C, se cree que cualquier péptido dará buenos rendimientos y fácil recuperación utilizando los vectores, hospedadores y/o técnicas de fermentación descritos en el presente documento.

5 Otros aspectos opcionales de un vector preferido o de otros vectores para expresarse en el mismo hospedador como el vector represor

10 Opcionalmente, el vector preferido puede contener ácidos nucleicos que codifiquen un péptido represor capaz de reprimir la expresión controlada por al menos uno de los promotores. De manera alternativa, sin embargo, los ácidos nucleicos que codifican un péptido represor pueden estar presentes en un vector separado en una célula hospedadora con el vector. Se conocen en la técnica represores adecuados para un gran número de operadores. Preferentemente, los ácidos nucleicos que codifican el represor codifican un represor lac debido a que reprime el operador lac que está incluido con ambos promotores tac y lac, al menos uno de tales promotores siempre está presente en los vectores preferidos.

15 Marcador seleccionable

20 Se prefiere que esté presente en el vector uno cualquiera de un gran número de genes marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen que codifique la resistencia a la kanamicina). Esto permitirá la selección específica apropiada de células hospedadoras que han sido transformadas o transfectadas eficazmente por el nuevo vector.

Péptido que mejora la secreción

25 Están presentes de manera opcional en el vector, ácidos nucleicos que codifican al menos un péptido que mejora la secreción. De manera alternativa, los ácidos nucleicos que codifican un péptido que mejora la secreción pueden estar presentes en un vector separado expresado en la misma célula hospedadora que el vector que codifica el producto peptídico. Preferentemente, el péptido que mejora la secreción se selecciona de entre el grupo que consiste en SecY (prlA) o prlA-4. Hay que puntualizar que SecY y prlA son idénticos, los dos términos se han utilizado como sinónimos en la técnica. prlA-4 es una modificación conocida de prlA y tiene una función similar. Otro péptido preferido que mejora la secreción es SecE también conocido como "prlG", un término utilizado como sinónimo de "SecE". Más preferentemente, se codifica una pluralidad de péptidos que mejoran la secreción, al menos uno de los cuales es SecE y el otro se selecciona de entre el grupo que consiste en SecY (prlA) y prlA-4. Se cree que los dos interaccionan para ayudar a la translocación del producto peptídico del citoplasma al periplasma. Sin la intención de quedar ligado por teoría alguna, estos péptidos que mejoran la secreción pueden ayudar a proteger el producto peptídico de las proteasas citoplasmáticas además de sus funciones de aumento de la secreción.

35 Método de producción de un péptido heterólogo

40 Se proporcionan nuevas condiciones de fermentación para el cultivo de células hospedadoras a densidades celulares muy altas bajo condiciones de cultivo que permitan la difusión o excreción del producto peptídico en el medio de cultivo con un alto rendimiento.

45 Las células hospedadoras útiles en la nueva fermentación incluyen pero sin limitación, las células hospedadoras tratadas anteriormente, y/o células hospedadoras transformadas o transfectadas con uno o más de los nuevos vectores de expresión tratados anteriormente. Se pueden utilizar otras células hospedadoras modificadas genéticamente para expresar el producto peptídico junto con una región de señal. Las células se colocan en un fermentador que incluya preferentemente medios apropiados de alimentación de aire u otros gases, una fuente de carbono, y otros componentes del medio y medios para la inducción del promotor. También se prefiere que tenga los medios apropiados para el control del contenido de oxígeno, densidad celular, pH y similares.

50 Los solicitantes han descubierto que se obtiene una mejora significativa del rendimiento del producto peptídico expresado directamente en el medio de cultivo controlando cuidadosamente la media de la tasa de crecimiento celular en un intervalo crítico entre 0,05 y 0,20 duplicaciones por hora. Se prefiere que este crecimiento controlado empiece en la fase de latencia temprana del cultivo. Es más preferible mantener la media de la tasa de crecimiento celular durante el periodo de fermentación (es decir, el periodo durante el que el crecimiento se controla como se muestra en el presente documento), entre 0,10 y 0,15 duplicaciones por hora, más preferentemente en 0,13 duplicaciones por hora. La tasa de crecimiento puede controlarse ajustando cualquiera de los parámetros expuestos posteriormente en la sección titulada "Producción de sCTgly (Fermentación)", específicamente la fórmula que iguala la tasa de alimentación "Q" a otros numerosos parámetros. Los solicitantes han descubierto que la variación de la tasa de la fuente de carbono que alimenta las células en fermentación es un método ventajoso de mantener la tasa de crecimiento en el intervalo crítico. Con el fin de mantener la tasa de crecimiento relativamente constante, la cantidad de fuente de carbono que se introduce en el fermentador tiende a incrementarse proporcionalmente al crecimiento en número de las células.

Los solicitantes también han descubierto que se puede obtener rendimiento significativamente mejorado proporcionando un inductor y vitaminas durante dicho periodo de fermentación de crecimiento controlado. Como fuente de carbono, alimentar con cantidades apropiadas del inductor implica el incremento de la tasa de alimentación proporcionalmente al crecimiento del número de células. Puesto que tanto la alimentación con la fuente de carbono como con el inductor se incrementa de una manera ligada al crecimiento celular, los solicitantes han descubierto que es ventajoso mezclar la alimentación y el inductor juntos y alimentar con la mezcla de los dos a la tasa apropiada para controlar el crecimiento celular (con la fuente de carbono), de esta manera se mantiene simultáneamente una alimentación continua de inductor que permanece a una tasa constante en relación a la cantidad de la fuente de carbono. Sin embargo, por supuesto es posible alimentar con la fuente de carbono y el inductor separadamente. Incluso entonces, sin embargo, si se utiliza un inductor químico que pudiera ser tóxico para las células en grandes cantidades, es deseable que el inductor y la fuente de carbono se añadan durante cada hora de cultivo en tales cantidades que la relación de peso entre el inductor añadido en cada hora determinada y la fuente de carbono añadida en esa misma hora no varíe más del 50 % de la relación de la cantidad de inductor añadido durante todo el proceso de fermentación (periodo de crecimiento controlado) con respecto a la cantidad de fuente de carbono añadida durante todo el proceso de fermentación. La variación del 50 % se mide desde la relación más baja de las dos relaciones que se comparan. Por ejemplo, cuando la relación de la fuente de carbono con respecto al inductor para la fermentación completa es de 2 a 1, la relación en cualquier hora determinada preferiblemente no será mayor de 3 a 1 y no será menor de 1,333 a 1. También es posible inducir uno o más de los promotores durante el crecimiento por otros medios tales como una modificación de la temperatura del cultivo o cambiando la concentración de un nutriente o compuesto en particular.

Cuando se utiliza una alimentación por fuente de carbono externa como método para controlar el crecimiento celular, es útil esperar hasta que cualquiera de las fuentes de carbono que estaban en el medio inicialmente (antes de la alimentación por fuente de carbono externa) se hayan agotado hasta el punto que el crecimiento celular no pueda mantenerse más sin iniciar una alimentación con una fuente de carbono externa. Esto asegura que la alimentación externa tiene un control más directo sobre el crecimiento celular sin interferencias significativas de las fuentes (no de alimentación) de carbono iniciales. Se prefiere que una fuente de oxígeno alimente continuamente el medio de fermentación midiendo los niveles de oxígeno disuelto. Un pico de subida en el nivel de oxígeno indica una caída significativa del crecimiento celular que puede a su vez indicar el agotamiento de la fuente de carbono inicial y significa que es la hora de empezar la alimentación externa.

Se ha descubierto inesperadamente que el rendimiento del producto peptídico aumenta según aumenta la saturación de oxígeno del medio de fermentación. Esto es cierto incluso aunque sean suficientes niveles de saturación más bajos para mantener el crecimiento celular. Por tanto, durante todo el proceso de fermentación, se prefiere que se alimente el medio de fermentación con una fuente de oxígeno u oxígeno enriquecido, y que se alcance al menos el 20 % y preferentemente al menos el 50 % de saturación de oxígeno. Como se utiliza en el presente documento "saturación de oxígeno" significa el porcentaje de oxígeno en el medio de fermentación cuando el medio está completamente saturado con aire ordinario. En otras palabras, el medio de fermentación saturado con aire tiene una "saturación de oxígeno" del 100 %. Aunque es difícil mantener una saturación de oxígeno del medio de fermentación por encima del 100 %, es decir, por encima del contenido en oxígeno del aire, esto es posible, e incluso deseable en vista de que los mayores contenidos en oxígeno proporcionan mayores rendimientos. Esto se puede conseguir difundiendo en el medio gases que tengan un contenido en oxígeno mayor que el aire.

Se puede alcanzar un rendimiento mejorado significativamente manteniendo una saturación de oxígeno en el medio de fermentación no menor del 70 %, especialmente no menor del 80 %. Estos niveles son relativamente fáciles de mantener.

Una agitación más rápida puede ayudar a aumentar la saturación de oxígeno. Una vez que el medio de fermentación comienza a espesarse, se vuelve más difícil mantener la saturación de oxígeno, y se recomienda alimentar con gases con un contenido de oxígeno mayor que el aire al menos durante esta etapa. Los solicitantes han descubierto que el aire ordinario puede ser suficiente para mantener una buena saturación de oxígeno hasta relativamente tarde en el periodo de fermentación. Los solicitantes han complementado la alimentación de aire con una alimentación de oxígeno al 50 % o una alimentación de oxígeno al 100 % más tarde en el periodo de fermentación. Preferentemente, la célula hospedadora se cultiva durante un periodo entre 20 y 32 horas (tras comenzar el crecimiento controlado), más preferentemente entre 22 y 27 horas, más preferentemente durante aproximadamente 23-26 horas y más preferentemente aproximadamente 24 horas. El periodo de cultivo durante el crecimiento controlado se divide en dos etapas: una etapa de alimentación de gradiente de fuente de carbono seguido por una etapa de alimentación constante con la fuente de carbono. El inductor y las vitaminas siempre se añaden durante ambas etapas. La etapa de alimentación de gradiente se lleva a cabo preferentemente durante aproximadamente 12 a 18 horas, más preferentemente aproximadamente 15 horas, mientras que la etapa de alimentación constante se lleva a cabo preferentemente durante aproximadamente 7 a 11 horas, más preferentemente aproximadamente 9 horas.

Preferentemente las células hospedadoras se incuban a una temperatura entre 20 y 35 °C, más preferentemente entre 28 y 34 °C, más preferentemente entre 31,5 y 32,5 °C. Se ha descubierto que una temperatura de 32 °C es óptima en varias de las fermentaciones realizadas por los solicitantes.

Preferentemente, el pH del medio de cultivo es entre 6,0 y 7,5, más preferentemente entre 6,6 y 7,0 prefiriéndose especialmente 6,78-6,83 (por ejemplo, 6,8).

En realizaciones preferidas, la fermentación se lleva a cabo utilizando hospedadores transformados con un vector de expresión que tiene una región de control que incluye tanto un promotor tac como uno lac y una región codificante que incluye nucleótidos que codifican un péptido señal corriente arriba de los nucleótidos que codifican el precursor de la calcitonina de salmón. Tal vector de expresión incluye preferentemente una pluralidad, especialmente dos, casetes de transcripción en tándem. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "casetes de transcripción en tándem" significa que una región de control y codificante están seguidas por al menos una región de control adicional y al menos una región codificante adicional que codifica el mismo producto peptídico que la primera región codificante. Esto hay que distinguirlo de la expresión dicistrónica en la que una única región de control controla la expresión de dos copias de la región codificante. La definición permitirá cambios en la región codificante que no se relacionan con el producto peptídico, por ejemplo, la inserción, en el segundo casete de transcripción, de nucleótidos que codifican un péptido señal diferente que el que se codifica en el primer casete de transcripción.

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

Es típico que la producción del producto peptídico caiga significativamente al mismo tiempo aproximadamente que el crecimiento de las células en los medios de fermentación se convierte en insostenible dentro de la tasa de crecimiento preferida que se indicó anteriormente. En ese punto, la fermentación se para, se interrumpe la alimentación con la fuente de carbono y el inductor y el flujo de oxígeno. Preferentemente, el cultivo se enfría rápidamente para suprimir la actividad de proteasas y reducir así la degradación del producto peptídico. También es deseable modificar el pH a un nivel que reduzca sustancialmente la actividad proteolítica. Cuando se produce el precursor de la calcitonina de salmón utilizando los vectores preferidos y las células hospedadoras, la actividad proteolítica disminuye según se baja el pH. Preferentemente, esta acidificación transcurre simultáneamente al enfriamiento de los medios. Los intervalos de pH preferido se analizan con mayor detalle posteriormente. El mismo ensayo que se ha utilizado para medir el producto de fermentación se puede utilizar para medir la degradación a distintos niveles de pH, estableciendo de esta forma el pH óptimo para un determinado péptido y sus impurezas.

#### Recuperación del péptido heterólogo

La presente divulgación además proporciona un método para recuperar el producto peptídico que comprende separar las células hospedadoras del medio de cultivo y posteriormente someter el medio de cultivo al menos a un tipo de cromatografía seleccionada de entre el grupo que consiste en cromatografía de filtración en gel, de intercambio iónico (preferentemente de intercambio catiónico cuando el péptido sea calcitonina), en fase inversa, afinidad y de interacción hidrófoba. En un péptido que contiene restos de cisteína, se puede llevar a cabo una S-sulfonación antes o durante las etapas de purificación con el fin de prevenir la agregación del péptido y de esta manera aumentar el rendimiento del péptido monomérico. Preferentemente se utilizan tres etapas de cromatografía en el siguiente orden: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa y otra cromatografía de intercambio iónico.

Después de completarse la fermentación, el pH del cultivo se altera opcionalmente para reducir la actividad proteolítica. El ensayo utilizado para medir la producción del producto también se puede utilizar para medir la degradación del producto y para determinar el mejor pH para la estabilidad. Cuando se produce el precursor de la calcitonina de salmón de acuerdo con la invención, se prefiere un pH entre 2,5 y 4,0, especialmente entre 3,0 y 3,5. Se cree que estos intervalos de pH también ayudan a la retención del precursor de la calcitonina de salmón en las columnas de intercambio, proporcionando así una purificación mejor durante una técnica de purificación preferida descrita en el presente documento.

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

La presente divulgación además proporciona un método para producir un producto peptídico amidado que comprende las etapas de: cultivar, en un medio de cultivo, cualquiera de las células hospedadoras de la presente invención que expresan un producto peptídico que tiene una glicina en el extremo C; recuperar dicho producto peptídico de dicho medio de cultivo; amidar dicho producto peptídico poniendo en contacto dicho producto peptídico con oxígeno y un agente reductor en presencia de peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -amidante, o peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -hidroxilante. Si no se utilizó la peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -amidante anteriormente en el presente documento, y si la mezcla de la reacción no es aún básica, entonces se incrementa el pH de la mezcla de reacción hasta que sea básico. El péptido amidado puede recuperarse a continuación de la mezcla de reacción.

Ejemplo 1 – Identificación de los genes diana responsables de la degradación del producto peptídico extracelular en las células hospedadoras

**Sumario**

5 Los solicitantes han identificado como se describe posteriormente una metaloproteasa de *E. coli* que es la responsable de la degradación de sCTgly extracelular a un ritmo de hasta el 25 % por h durante las 18-26 h de la fase de post inducción del protocolo de fermentación de expresión directa de sCTgly. La degradación de sCTgly también se presenta antes de las 17 h a un ritmo no determinado. Los experimentos detallados posteriormente  
10 indicaron que la proteasa responsable de la degradación de sCTgly es la proteasa III del gen *ptr* de *E. coli*.

**Introducción**

15 La proteasa III es una metaloproteasa de zinc de 107 kDa que degrada preferentemente péptidos < 12 kDa. La bibliografía indica que la actividad de la Proteasa III tiene propiedades parecidas a la quimotripsina. La proteasa III escinde la cadena B de la insulina entre Tyr-Leu y entre Phe-Tyr con una tasa reducida. No parece haber un papel fisiológico crítico para la proteasa III y su delección no produce efectos perjudiciales sobre el crecimiento del hospedador (Dykstra *et al.* J. Bacteriol. 163: 1055-1059; 1985). La actividad de la proteasa III frecuentemente se ha encontrado en el medio de crecimiento, especialmente en periodos de secreción aumentada (Diaz-Torres *et al.* Can. J. Microbiol. 37: 718-721; 1991). Este estudio resume los experimentos que examinan la pérdida de nuestro péptido modelo, el sCTgly, debido a la actividad proteolítica en el medio de cultivo durante las fermentaciones y la mutagénesis de una cepa de *E. coli* para la eliminación de la actividad de la Proteasa III.

**Degradación proteolítica e identificación**

25 **Degradación del sCTgly en el medio acondicionado**

Las muestras de medio acondicionado de fermentaciones de expresión directa tanto de UGL 165 (*E. coli* BLR transformada con pSCT 029) como de UGL 703 (*E. coli* BLR transformada con pSCT 038) se ensayaron para ver la pérdida de sCTgly después de la eliminación de las células y la incubación del medio enriquecido con sCTgly a 30 °C. La concentración de sCTgly en el medio acondicionado de fermentación se midió por HPLC CEX. La Tabla 2 muestra los datos de un ensayo típico de degradación de sCTgly de una muestra de medio de 26 h recolectado de la fermentación de UGL 703. Se ensayaron varios inhibidores de proteasa, incluyendo la Bestatina, PMSF,  $\alpha_2$ -macroglobulina y EDTA para ver la capacidad de reducir o eliminar la degradación proteolítica del sCTgly. Solamente el EDTA fue capaz de reducir la degradación proteolítica del sCTgly. El EDTA inactiva las metaloproteasas uniéndose a los cationes divalentes necesarios para su actividad. Aunque el EDTA fue capaz de reducir la degradación proteolítica del sCTgly, se producía alguna degradación residual de sCTgly que puede ser el resultado de otras proteasas menos activas o de la actividad de la proteasa III residual.

Tabla 2 – Inhibición de la degradación proteolítica por el EDTA

Muestra Control de Medio de Fermentación				Muestra de Medio Tratado con EDTA 50 mM		
Tiempo de incubación a 30 °C	sCTgly (mg/l)	% intacto	% de pérdida desde h ant.	sCTgly (mg/l)	% intacto	% de pérdida desde h ant.
t= 0 minutos	241	100 %	0,0 %	214	100 %	0,0 %
t= 60 minutos	181	75 %	25 %	184	86 %	14 %
t= 120 minutos	140	58 %	23,6 %	179	84 %	2,7 %
t= 180 minutos	107	44 %	23,6 %	168	79 %	5,9 %

40 La tasa de degradación de sCTgly también se examinó a ~18 h post inducción en una fermentación de 1,25 l. Se añadió sCTgly recombinante en un medio recolectado a las 18 h post inducción para elevar la concentración de sCTgly de 37 mg/l a 200 mg/l y se incubó durante 4 h a 30 °C, y luego se analizó como anteriormente para el sCTgly. Los resultados se enumeran en la Tabla 3.

45 **Tabla 3 – Degradación de sCTgly Durante la Fermentación**

Tiempo de incubación 30 °C	Concentración de sCTgly (mg/l)
0,0 h	185
2,0 h	99
4,0 h	65

Al final de las 4 h la media de degradación del sCTgly por h en la muestra de 18 h ensayada era del 21 % lo que es similar a los ritmos de degradación de sCTgly vistos del medio de fermentación recolectado. Este resultado indica

que desde las 18 h post inducción la degradación de sCTgly en el medio de fermentación puede ser constante.

**Identificación de la proteasa extracelular primaria**

5 Los experimentos previos indican que la proteasa responsable de la degradación primaria del sCTgly era una metaloproteasa. La proteasa III de *E. coli* es una metaloproteasa de zinc periplasmática / extracelular (hospedador (Dykstra *et al.* J. Bacteriol. 163:1055-1059, 1985); secreción (Diaz-Torres *et al.* Can. J. Microbiol. 37: 718-721, 1991)). Se ensayó la preferencia por el zinc comparándola con otro catión divalente, el magnesio. Las muestras del medio de fermentación se pre-incubaron con EDTA 50 mM durante 20 minutos, luego se añadió sCTgly en la muestra hasta una concentración final de ~250 mg/l. Se añadieron a diferentes muestras ZnCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub> 15 mM y se incubaron a 30 °C durante 4 h. Se midió la concentración de sCTgly como anteriormente y los resultados se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4 – Especificidad por el Catión Divalente

H de incubación	Medio solo sCTgly (mg/l)	Medio + EDTA sCTgly (mg/l)	Medio + EDTA + MgCl <sub>2</sub> sCTgly (mg/l)	Medio + EDTA + ZnCl <sub>2</sub> sCTgly (mg/l)
0,0	175	295	241	244
1,0	155	223	219	194
2,0	103	211	199	140
4,0	23	193	175	67

15 El sCTgly añadido en el medio de control sin tratar se degradó un 87 % tras 4 h de incubación. El pretratamiento del medio acondicionado con EDTA antes de la adición de sCTgly dio como resultado una pérdida del 34 %. La adición de MgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> dio como resultado unas pérdidas de péptido del 27 % y el 72 %, respectivamente. Un gráfico de los resultados de la degradación muestra tasas de degradación similares para la muestra control y para la ZnCl<sub>2</sub>, así como tasas similares para las muestras tratadas con el EDTA y el MgCl<sub>2</sub>. La adición de los dos cationes divalentes para la reactivación de la actividad proteolítica mostró que el zinc era eficaz, mientras que el magnesio no.

Además del ensayo de la especificidad de los cationes divalentes de la proteasa en cuestión, se llevaron a cabo experimentos utilizando cepas de *E. coli* KS272 y SF 103. La *E. coli* SF 103 es una cepa K12 en la que el gen *ptr* se ha alterado (descrito anteriormente). La KS272 es la cepa parental de SF103, que porta el gen *ptr* tipo silvestre. Los experimentos de fermentación se llevaron a cabo ensayando la degradación proteolítica del sCTgly expresado en UGL177 (KS272 + pSCT 029) y UGL 178 (SF103 + pSCT 029).

En el primer experimento, se añadió sCTgly en 0,5 l de fermentaciones no inducidas de UGL177 y 178 en el tiempo de alimentación t=0 a una concentración de 200 mg/l. Se hizo también un control de fermentación de cada cepa sin añadir sCTgly. Las muestras del medio acondicionado de las cuatro fermentaciones se recolectaron a las 4, 18 y 20 h tras el inicio de la alimentación. Cuando se tomaron las muestras a las 18 h, ambos cultivos habían terminado el crecimiento y mostraban signos de muerte celular y lisis. Debido a los problemas de crecimiento, solamente se ensayaron el medio en el punto temporal de 4 h de alimentación de ambas fermentaciones UGL177 y 178 para determinar la actividad proteolítica. A las cuatro muestras de medio en el punto temporal de 4 h se les añadió sCTgly a 200 mg/l. Las muestras con sCTgly añadido se dividieron y un grupo se trató con EDTA 50 mM, como control. Las 8 muestras se incubaron durante 20 h a temperatura ambiente (se utilizó una incubación prolongada debido a la baja densidad celular a las 4 h post inducción). Los resultados de la incubación se enumeran en la Tabla 5. Las concentraciones de sCTgly de las cuatro muestras de medio se evaluaron con respecto al sCTgly inicial añadido en la fermentación.

Tabla 5 – Degradación proteolítica de sCTgly de *E. coli* KS272 y SF103

Tiempo de incubación	UGL177		UGL178	
	sCTgly (mg/l)	% pérdida de sCTgly	sCTgly (mg/l)	% pérdida de sCTgly
0,0 h	226	0	233	0
20,0 h	129	42,8	210	10,1
0,0 h + EDTA	204	0	198	0
20,0 h + EDTA	161	20,9	173	12,4
0,0 h*	323	0	346	0
20,0 h*	212	34,3	316	8,7
0,0 h + EDTA*	268	0	281	0
20,0 h + EDTA*	219	18	246	12,3

\* Muestras de medio de fermentación con sCTgly añadido

Los datos muestran una diferencia entre la cantidad de degradación de sCTgly en el medio acondicionado de la cepa menos la proteasa III comparada con la cepa parental. La cepa parental mostró casi cuatro veces la pérdida de sCTgly en las muestras de medio acondicionado en comparación con la cepa menos la proteasa III. La degradación de sCTgly en la cepa parental fue aproximadamente dos veces mayor que la de la cepa menos la proteasa III cuando se trató con EDTA, lo que sugiere que la degradación en las muestras tratadas con EDTA puede ser debido parcialmente a la inactivación incompleta de la proteasa III.

El segundo experimento ensayaba la capacidad de cada cepa para mantener la expresión de sCTgly. Las dos cepas de *E. coli* UGL177 y 178 se cultivaron e indujeron utilizando el protocolo de fermentación de expresión directa similar al de la CBK.025. Las muestras del medio acondicionado se recogieron para su análisis a las 10, 12, 14, 16 y 17 horas post inducción. Los dos cultivos de fermentación tenían tasas similares de crecimiento confirmando que la delección del gen *ptr* no producía un impacto sobre la viabilidad del cultivo. Sin embargo, como en el experimento anterior, ambos cultivos morían entre las 16 y 17 h post inducción. Ensayos previos con cepas *E. coli* K-12 con el protocolo de fermentación de expresión directa de alta densidad celular mostraron un descenso en la viabilidad del cultivo durante las etapas medias del protocolo de fermentación. La producción de sCTgly en los puntos temporales de recogida de cada cultivo se enumera en la Tabla 6.

Tabla 6 – Expresión de sCTgly en UGL177 y UGL178

Tiempo post inducción	UGL177 sCTgly (mg/l)	UGL178 sCTgly (mg/l)
10,0 h	0,0	43
12,0 h	0,0	46
14,0 h	0,0	46
16,0 h	0,0	40
17,0 h	0,0	34

Los resultados enumerados en la Tabla 6 muestran que solamente la cepa con el gen *ptr* eliminado era capaz de acumular sCTgly en niveles cuantificables. Los resultados anteriores sugieren que la represión o la eliminación de proteasa III de *E. coli* en la producción de cepas de *E. coli* debería ofrecer una ventaja en la producción de sCTgly.

**Estimación de la pérdida de sCTgly debido a la actividad proteolítica**

Asumiendo una pérdida conservadora de sCTgly del 20 % por h durante la fermentación de UGL703 (pSCT 038 en BLR) a 30 °C, es posible calcular la cantidad total de pérdida de sCTgly durante las últimas etapas de la fermentación. Esta proyección se basó en los datos de producción de la fermentación 2301-9004 a las 17 hasta las 26 h post inducción. Se promedió la concentración de sCTgly de cada par consecutivo de horas. La concentración promediada de sCTgly se multiplicó entonces por 0,2 para calcular la cantidad de sCTgly que debería haberse degradado asumiendo una media de degradación del 20 % por hora. Asumiendo que la cantidad de sCTgly perdido durante cada h es acumulativa, se podría extrapolar la cantidad de sCTgly perdida por hora y sobre el transcurso del periodo de nueve h. Los resultados de esta extrapolación se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7 – Pérdida estimada de sCTgly durante la Fermentación

Tiempo post inducción	sCTgly (mg/l)	Puntos de tiempo promediados h	sCTgly promediado (mg/l)	Nivel de degradación de sCTgly del 20 % (mg/l)
17,0 h	21,6	17-18 h	22,4	4,5
18,0 h	23,2	18-19 h	24,1	4,8
19,0 h	25	19-20 h	42,25	8,5
20,0 h	59,5	20-21 h	70,15	14,0
21,0 h	90,8	21-22 h	95,15	19,3
22,0 h	99,5	22-23 h	110,0	22,0
23,0 h	120,5	23-24 h	139,9	28,0
24,0 h	159,3	24-25 h	172,2	34,4
25,0 h	185,1	25-26 h	186,6	37,3
26,0 h	188,1		Pérdida total de sCTgly	172,5 mg/l

Se estimó el nivel de degradación del medio acondicionado solo; la degradación que se produce en las células no se puede calcular y no se incluyó. Los resultados mostrados en la Tabla 7 sugieren una pérdida de sCTgly de 171,5 mg/l durante el curso de la fermentación. El sCTgly total que debería haberse producido si el 20 % de degradación no se produjera se puede estimar en 360 mg/l, aproximadamente 91 % más alto que la capacidad de producción actual utilizando la línea celular UGL703.

Ejemplo 2 – Construcción de una *E. coli* deficiente en proteasa

**Alteración de la función de *ptr* y *recA* en *E. coli* BL21**

Se modificó *E. coli* introduciendo alteraciones en las regiones codificantes del gen *ptr*, que codifica la Proteasa III, y el gen *recA*. Utilizando la transducción de P1, el ADN de *E. coli* SF 103 se empaquetó en el fago bacteriano P1 y se utilizó para infectar células de *E. coli* BL21. La mezcla de fago celular se puso en placas de agar LB que contenían cloranfenicol; solamente las células que tuvieran el gen *ptr* del cloranfenicol alterado deberían tener la capacidad de crecer en presencia de cloranfenicol. Se verificaron también diez transductantes resistentes al cloranfenicol con respecto a marcadores genéticos de BL21, tales como la capacidad de crecer en lactosa y sensibilidad a la estreptomycin. Las cepas BL21Δ*ptr* resultantes se modificaron además por transducción de P1 con la cepa BLR de *E. coli*, que porta un genotipo *recA*. El gen *recA* alterado por tetraciclina de BLR se utilizó para la transducción de la BL21Δ*ptr* creando una cepa BL21 *ptr*<sup>-</sup> *recA*<sup>-</sup>. Se identificaron veinte transductantes BL21 *ptr*<sup>-</sup> *recA*<sup>-</sup>. A los veinte aislados se les designó como BLM1-20.

**Análisis de expresión utilizando las cepas BLM de *E. coli***

Se transformaron ocho cepas BLM de *E. coli*, BLM1-8, con el vector de expresión pSCT-038 de sCTgly y se les dio la denominación de UGL801. Se seleccionaron dos aislados de cada transformación para la expresión de sCTgly en matraces agitadores. Se inocularon 25 ml de Medio de Inoculación I CPM que contenía kanamicina 50 ug/ml con 700 μl de un cultivo de una noche de cada clon. Los cultivos se cultivaron hasta una DO de 600 nm de 2-3, entonces se indujeron con IPTG 150 μM y se cultivaron 4 h adicionales. Los resultados para las muestras de 4 h y un control UGL703 se enumeran en la Tabla 8. Se seleccionaron también seis de los clones UGL801 en una fermentación de 1,25 litros utilizando el protocolo de expresión directa reseñado para CBK.025. Los resultados de las muestras seleccionadas de cada fermentación se enumeran en la Tabla 9.

Doce de los clones produjeron niveles detectables de sCTgly en el medio acondicionado de los experimentos en matraces agitadores. El nivel de sCTgly de los doce clones aumentó entre las 3 h a las 4 h post inducción. Por el contrario el control UGL703 no mostró un aumento entre las 3 h y las 4 h post inducción. El crecimiento de los doce clones fue similar, con la excepción de dos clones UGL801-6, los cuales alcanzaron densidades celulares significativamente más bajas.

Tabla 8 – Resultados de la Expresión en matraces agitadores para los clones UGL801

Clon UGL801 Ensayado	DO a 600 nm 4 h post inducción	sCTgly μg/ml 3 h post inducción	sCTgly μg/ml 4 h post inducción
UGL801-1a	13,9	35	48
UGL801-1a	15,9	36	48
UGL801-2a	15,76	32	52
UGL801-2b	14,01	31	50
UGL801-3a	16,5	5,8	13
UGL801-3b	12,5	8,3	19
UGL801-4a	12,3	39	56
UGL801-4b	11,4	30	51
UGL801-5a	17	27	48
UGL801-5b	18,3	21	39
UGL801-6a	8,65	27	31
UGL801-6b	8,66	20	31
UGL801-7a	15,3	24	41
UGL801-7b	17,1	19	33
UGL801-8a	19,8	12	18
UGL801-8b	19,5	12	26
UGL703 control	15,7	33	35

Se ensayaron seis clones (UGL801-1a, 2a, 3a, 4a, 5a, y 6a) para determinar la expresión de sCTgly utilizando los protocolos de fermentación de expresión directa, en una fermentación de 1,25 l. Todas las fermentaciones produjeron sCTgly a niveles por encima de 170 mg/l, alcanzando la mayoría una producción máxima de más de 200 mg/l. Todos los clones excepto UGL801 – 6a produjeron niveles máximos de sCTgly antes del final del protocolo de fermentación a las 26 h post inducción (véase Tabla 9). Las muestras de estas fermentaciones contenían grandes cantidades de precipitación después del ajuste del pH a 3,0 como en los procedimientos de referencia. La única excepción a este fenómeno fue UGL801 – 6a, que produjo sCTgly hasta las 26 h post inducción y no mostró precipitación en las muestras de medio ajustadas a un pH de 3,0. El UGL801 – 6a también produjo el nivel de expresión más alto de sCTgly alcanzando 256 mg/l en el medio acondicionado a las 26 h post inducción. El UGL801 – 6a también tenía el peso celular húmedo más alto de todas las ejecuciones que se enumeran en la Tabla 9. Basándose en los datos obtenidos de los ensayos de fermentación, se escogió el UGL801 – 6a para desarrollar más la producción de sCTgly. La cepa hospedadora correspondiente BLM – 6 (Número de registro ATCC PTA-5500) se

utilizó como la línea celular preferida para la inserción de otros genes de péptidos contenidos en plásmidos.

Tabla 9 – Resultados de productividad de las fermentaciones de UGL 801

Clon UGL801	Referencia	Peso húmedo máx. g/l/h post inducción	Máx. producción de sCTgly mg/l/h post inducción
UGL801-1a	CPM:15:185	116 / 26 h	212 / 25 h
UGL801-2a	CPM:15:190	111 / 26 h	183 / 25 h
UGL801-3a	CPM:15:210	117 / 25 h	211 / 23 h
UGL801-4a	CPM:15:200	105 / 25 h	226 / 23 h
UGL801-5a	CPM:15:205	114 / 25 h	180 / 24 h
UGL801-6a	CPM:15:195	153 / 26 h	256 / 26 h

5 El UGL801 – 6a se denomina ahora como UGL801 (Número de registro ATCC PTA- 5501) y se ha elegido para desarrollarlo más y a mayor escala para la producción. La cepa hospedadora de *E. coli* BLM-6 (F-ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm Δ (srl-recA) 306:: Tn 10 (Tc<sup>R</sup>) ptr32:: ΩCat<sup>R</sup>) (Número de registro ATCC PTA-5500), que es el hospedador para UGL801 se utilizará como hospedador preferido para la expresión de líneas celulares. En consecuencia, se utilizó BLM-6 para la inserción de los vectores de expresión que expresan PTH 1-31gly y PTH 1-34gly que generan las líneas celulares UGL810 (Número de registro ATCC PTA-5502) y UGL820 (Número de registro ATCC PTA 5569), respectivamente.

Ejemplo 3 – Protocolo de fermentación para UGL801

15 Como se indicó anteriormente, el vector plasmídico, pSCT038, se utilizó para transformar la cepa hospedadora BLM-6 para que diera lugar a la línea celular recombinante UGL801. El desarrollo de las condiciones optimizadas de fermentación para la nueva línea celular, UGL801, empezó con la evaluación de la línea celular UGL801 para producir sCTgly utilizando las condiciones de expresión directa para UGL703 (la línea celular UGL703, es *E. coli* BLR que alberga el plásmido pSCT038): ciclo de fermentación semicontinua limitada por el sustrato a 30 °C, pH 6,6, dO<sub>2</sub> ≥ 70 %, durante 26 horas de alimentación inducida en un medio desarrollado para UGL703. La UGL703 en el protocolo inicial de fermentación de ED dio como resultado un rendimiento volumétrico de <200 mg/l y un rendimiento específico de ~1,3 mg de sCTgly extracelular por gramo de peso húmedo celular de las células. Las modificaciones en la célula hospedadora dieron como resultado la célula BML-6, y la línea celular recombinante UGL801, que cuando se ensayó en las condiciones de fermentación de UGL703 mostraron un aumento volumétrico de ~1,3x para ser mayor de 200 mg/l a las 26 horas post inducción y un incremento 1,2x en el rendimiento específico a las 26 horas post inducción. Estos datos se muestran en la Tabla 10. La introducción de la línea celular UGL801 en un entorno con su proteasa reducida y su capacidad para crecer y producir proteína recombinante sin degradar más pronto en la fermentación fueron mejoras significativas en el rendimiento y en la fiabilidad del proceso.

Tabla 10: Una comparación de la productividad específica y la productividad volumétrica de UGL703 y UGL801 sin cambiar las condiciones de fermentación.

H post alimentación	Productividad Específica			Productividad Volumétrica		
	UGL703 en Condiciones de Fermentación de ED	UGL801 con condiciones de UGL703	Factor de aumento	UGL703 en Condiciones de Fermentación de ED	UGL801 con condiciones de UGL703	Factor de aumento
19	0,4	1,9	5,2	32	164	5,1
20	0,6			55		
21	0,6	1,8	3,2	59	182	3,1
22	1,0			108		
23	0,9	1,8	2,0	108	207	1,9
24	1,3	1,7	1,3	160	217	1,4
25	1,3	1,7	1,3	177	221	1,2
26	1,3	1,6	1,2	184	230	1,3

30 Después de comparar directamente los resultados de las dos líneas celulares con el mismo protocolo de fermentación, se llevaron a cabo una serie de estudios de optimización de los parámetros de fermentación, incluyendo: el aumento de la temperatura; cambios en el programa de alimentación/inducción; adición de nuevos componentes de los medios; y extensión del periodo de alimentación/inducción.

35

### Incremento de temperatura

5 Durante el desarrollo de la nueva célula hospedadora BLM-6, una investigación de las características de la degradación de la proteasa a la temperatura de fermentación demostró que se producía una degradación rápida del péptido extendido con glicina a  $>30^{\circ}\text{C}$  cuando se utilizaba la célula hospedadora predecesora BLR. La nueva cepa deficitaria en proteasa, BLM-6, tenía una matriz de proteasa extracelular reducida, sugiriendo que podría cultivarse a una temperatura más alta para producir potencialmente más masa y más producto. Mientras se mantuvo el pH a 6,6, la temperatura de toda la fermentación, tanto la etapa discontinua como semicontinua, se aumentó a  $32^{\circ}\text{C}$ . La nueva línea celular recombinante basada en la BLM-6, la UGL801, creció bien a la temperatura elevada y expresó el sCTgly. Como se ve en la Tabla 11, las productividades volumétricas y específicas de la nueva línea celular aumentaron con el incremento de la temperatura de fermentación.

15 Tabla 11: La comparación de valores de productividad de la fermentación de UGL801 con temperatura aumentada ( $32^{\circ}\text{C}$ ) con la fermentación inicial de UGL801 hecha de acuerdo con las condiciones de fermentación de ED de UGL703. Se muestra también el factor de aumento de la productividad específica con el aumento de temperatura

	UGL801 con condiciones de Fermentación de UGL703		UGL801 con temperatura de Fermentación aumentada		
H post alimentación	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Factor de aumento
19	164	1,9	239	3,0	1,5
21	182	1,8	283	3,3	1,8
23	207	1,8	312	3,4	1,9
24	217	1,7	298	3,0	1,7
25	221	1,7	276	2,7	1,6
26	230	1,6	286	2,2	1,4

Como se puede ver en los gráficos de la Figura 2, la productividad con la temperatura aumentada no era estable todo el periodo semicontinuo (inducción) del protocolo de fermentación. Se indicaba más investigación de desarrollo.

### 20 Cambios en el programa de alimentación / inducción

El programa de alimentación exponencial desarrollado para el procedimiento de fermentación de expresión directa de UGL703 (BRL::pSCT038) se alteró en un intento de aumentar la productividad por célula. La tasa de adición de alimento al medio se mantuvo constante a la tasa de alimentación a las 20 horas post inducción hasta el final de la ejecución a las 26 horas post inducción. Los resultados de este cambio se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Comparación de la productividad de UGL801 con la alteración en el programa de alimentación para permitir una tasa constante de alimentación entre las 20 y las 26 horas post inducción. También se presenta el factor de aumento de la mejora

	UGL801 con temperatura de Fermentación aumentada		Tasa de alimentación constante de UGL801 de las 20 a las 26 horas		
H post alimentación	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Factor de aumento
19	239	3,0	255	3,5	1,2
21	283	3,3	300	3,8	1,2
22			341	4,2	
23	312	3,4	335	3,9	1,1
24	298	3,0	341	4,0	1,3
25	276	2,7	366	4,0	1,5
26	286	2,2	372	4,0	1,8

### Adición de nuevos componentes a los medios

30 Generalmente se asume que la mayoría de las vitaminas y oligoelementos necesarios para el crecimiento celular se proporcionan a las células por medio de la adición de un extracto de levadura. Sin embargo, como la demanda de síntesis proteica aumentaba en estas células recombinantes, se identificó la necesidad de suministrar vitaminas y oligoelementos adicionales. El medio de alimentación se suplementó con una mezcla de vitaminas/oligoelementos; los resultados de los experimentos de fermentación mostraron que la adición de la mezcla ofrecía un nivel de estabilización de la productividad de la fermentación. La productividad y reproducibilidad con la adición de la mezcla

35

de vitaminas/oligoelementos sugiere que el periodo de alimentación constante podría extenderse más allá de las 26 h.

5 Tabla 13: Comparación de la productividad de UGL801 con la adición de una mezcla de vitaminas y oligoelementos durante todo el periodo de alimentación/inducción de 26 horas. También se presenta el factor de aumento de la mejora

	UGL801 Tasa de alimentación constante de 20 - 26 horas		UGL801, más vitaminas y oligoelementos		
H post alimentación	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Factor de aumento
19	255	3,5	235	3,2	0,9
21	300	3,8	288	3,4	0,9
22	341	4,2			
23	335	3,9	336	3,8	1,0
24	341	4,0	350	3,9	1,0
25	366	4,0	366	4,0	1,0
26	372	4,0	378	4,0	1,0

**Extensión del periodo de alimentación / inducción**

10 Se evaluó la viabilidad de extender el periodo de fermentación de alimentación semicontinua e inducción. La base para la extensión era que cuando la tasa de alimentación a las 20 horas se extendía a las 26 horas mostraba una producción constante de péptido extracelular con un aumento mínimo del peso celular húmedo. La suplementación del medio de alimentación con las vitaminas / oligoelementos sugería que la fermentación era lo suficientemente estable para extender la longitud del periodo de inducción más allá de las 26 horas. El periodo de alimentación / inducción de la fermentación se extendió de manera progresiva hasta las 29 horas. Otros datos sugirieron que las 29 horas podía ser el límite del periodo productivo de la fermentación sin pérdida de proteína o evidencia de lisis celular. El periodo de alimentación / inducción de la fermentación se extendió a 29 horas a la tasa constante de alimentación establecida a las 20 horas.

20 Tabla 14 – Productividades con la adición del periodo de alimentación / inducción extendido. El factor de aumento antes de la extensión es constante, sin embargo, durante las tres horas extras el rendimiento continúa aumentando aproximadamente un 20 %

	UGL801, más vitaminas y oligoelementos		UGL801: Fermentación Final Optimizada, Alimentación constante 20-29 horas		
H post alimentación	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Productividad volumétrica, mg/l	Productividad Específica, mg/gramo	Factor de aumento
19	231	3,2	253	3,1	1,0
21	283	3,4	288	3,3	1,0
23	338	3,8	345	3,7	1,0
24	356	4,0	364	3,8	1,0
25	381	4,1	385	4,1	1,0
26	403	4,2	409	4,2	1,0
27			429	4,3	
28			436	4,3	
29			461	4,5	

25 El desarrollo de la fermentación y la optimización para UGL801, *E. coli* BLM-6::pSCT038, dio como resultado un aumento de 2,6 veces en la producción extracelular de sCTgly por gramo (peso celular húmedo) de masa celular cuando la productividad de la línea celular en condiciones para UGL703 se comparó directamente con la productividad final optimizada de UGL801.

30 La siguiente Tabla 15 enumera los componentes de medio utilizados en diferentes fermentaciones.

Tabla 15

Componentes (medios CPM I)	Componentes (Medio discontinuo UGL703)	Componentes (Medio discontinuo UGL801)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O

CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O
Citrato Na <sub>3</sub>	Citrato Na <sub>3</sub>	Citrato Na <sub>3</sub>
N-Z Case +	N-Z Case +	N-Z Case +
Hy Yest 412	Hy Yest 412	Hy Yest 412
L-metionina	L-metionina	L-metionina
Kanamicina	Kanamicina	Kanamicina
Glicerol	Glicerol	Glicerol
	<b>Componentes del medio de alimentación</b>	<b>Componentes del medio de alimentación</b>
	L-leucina	L-leucina
	Kanamicina	Kanamicina
	Glicina	Vitaminas / oligoelementos
	Glicerol	Glicina
		Glicerol

**Conclusión**

5 La UGL703 en el protocolo de fermentación de expresión directa produjo niveles volumétricos de sCTgly extracelular <200 mg/l y una productividad específica de ~1,3 mg de péptido por gramo de peso húmedo celular de células. La creación de la célula hospedadora BLM-6 ofreció la primera mejora en la productividad reduciendo el nivel de fondo de proteasas. Cuando la BLM-6 se utilizó como hospedador para el vector plasmídico original, pSCT038, el resultado fue UGL801 con un 20-30 % de mejora en productividad. Se hicieron las mejoras adicionales, descritas en este documento, en el protocolo de fermentación para optimizar las productividades volumétrica y específica. Las siguientes tablas son comparaciones resumidas de las productividades volumétrica y específica empezando por UGL703 y progresando por la nueva línea celular, UGL801, y las cuatro mejoras hechas para optimizar el protocolo de fermentación. La suma de las mejoras en la fermentación aumentaron la productividad volumétrica de UGL801 2,2 veces al comparar los datos a las 26 horas post inducción, mientras que la productividad específica a las 26 horas p.i. aumentó más de 3 veces (3,2). La extensión de la ejecución a 29 horas dio un incremento volumétrico de ~12 %. Hubo un aumento de 3,46 veces en la productividad específica del protocolo final de fermentación para UGL801 a las 29 horas post inducción cuando se comparó con la productividad específica de UGL703 a las 26 horas.

Tabla 16 – Productividad volumétrica desde UGL703 a UGL801 optimizada

H post alimentación	Productividad Volumétrica					
	PV de UGL703	PV de UGL801 según UGL703	PV de UGL801 con incremento de Temperatura	PV de UGL801 con tasa de alimentación constante a las 20 h	PV de UGL801 más vit/oligoelem.	Tasa de alimentación extendida de UGL801
	32	164	239	255	231	253
19	55					
21	59	182	283	300	283	288
22	108					
23	108	207	312	335	338	345
24	160	217	298	341	356	364
25	177	221	276	366	381	385
26	184	230	286	372	403	409
27						429
28						436
29						461

20

Tabla 17 – Productividad específica desde UGL703 a UGL801 optimizada

H post alimentación	Productividad Específica					
	PE de UGL703	PE de UGL801 según UGL703	PE de UGL801 con incremento de Temperatura	PE de UGL801 con tasa de alimentación constante a las 20 h	PE de UGL801 más vit/Oligoelem.	PE de UGL801 con tasa de alimentación extendida
19	0,4	1,9	3,0	3,5	3,2	3,1
20	0,6					
21	0,6	1,8	3,3	3,8	3,4	3,3
22	1,0			4,2		
23	0,9	1,8	3,4	3,9	3,8	3,7
24	1,3	1,7	3,0	4	3,9	3,8
25	1,3	1,7	2,7	4	4,0	4,1
26	1,3	1,6	2,2	4	4,0	4,2
27						4,3
28						4,3
29						4,5

Aunque la presente invención se ha descrito en relación a realizaciones particulares de la misma, otras muchas variaciones y modificaciones y otros usos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. La presente invención por lo tanto no está limitada por la divulgación específica del presente documento, sino solamente por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula hospedadora *E. coli* modificada genéticamente deficiente en los genes cromosómicos *recA* y *ptr* que codifican la proteína A de recombinación y Proteasa III, respectivamente.
2. Una cepa BLM6 mutante de BRL que tiene el Número de Registro ATCC PTA-5500.
3. Una célula hospedadora *E. coli* modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, conteniendo y expresando dicha célula hospedadora *E. coli* un vector de expresión que comprende una pluralidad de casetes de transcripción en tándem, comprendiendo cada casete:
  - (1) una región codificante con ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico acoplada en marco de lectura 3' de ácidos nucleicos que codifican un péptido señal; y
  - (2) una región de control unida operativamente a la región codificante, comprendiendo dicha región de control una pluralidad de promotores.
4. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 3 que es UGL801 y tiene el Número de Registro ATCC PTA-5501.
5. Un método de producción de un producto peptídico que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 3 en un medio de cultivo y luego recuperar el producto peptídico del medio en el que se ha cultivado la célula hospedadora.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que no se introduce en el medio una fuente de carbono externa hasta que la fuente de carbono presente inicialmente se ha agotado hasta un nivel al que no podría continuar manteniendo la vida de dicho hospedador en ausencia de introducción de una fuente de carbono externa en el medio, y en el que la fuente de carbono se añade a partir de entonces a una tasa que mantenga dicha tasa de crecimiento entre 0,05 y 0,20 duplicaciones por hora.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que un método de inducción comienza antes de la fase estacionaria.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el método de inducción es por adición de un inductor químico.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la inducción es por adición de al menos un inductor seleccionado de entre el grupo que consiste en IPTG y lactosa.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se añaden un inductor, una fuente de carbono y vitaminas durante cada hora de las fases de inducción y estacionaria en cantidades tales que la relación de peso entre el inductor y la fuente de carbono añadidos en una hora cualquiera no varía en más del 50 % de la relación añadida durante el periodo completo de fermentación.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la célula hospedadora se cultiva durante un periodo de entre 20 y 32 horas post inducción.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la célula hospedadora se cultiva durante un periodo de entre 22 y 27 horas post inducción.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la célula hospedadora se cultiva a una temperatura entre 28 y 34 °C.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la célula hospedadora se cultiva a una temperatura entre 31,5 y 32,5 °C.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la fuente de carbono es glicerol.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la recuperación de dicho producto peptídico comprende:
  - (a) separar las células hospedadoras del medio de cultivo; y
  - (b) someter el medio a cromatografía líquida en fase inversa y recuperar fracciones que contienen el producto peptídico; y
  - (c) someter dichas fracciones de la etapa (b) a cromatografía de intercambio catiónico, y
  - (d) a continuación recuperar fracciones que contienen el producto peptídico.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la recuperación de dicho producto peptídico comprende:
- (a) separar las células hospedadoras del medio de cultivo; y
  - (b) someter el medio a cromatografía de intercambio catiónico y recuperar fracciones que contienen dicho producto peptídico; y
  - (c) someter la fracción recuperada de la etapa (b) a cromatografía líquida en fase inversa y recuperar fracciones que contienen producto peptídico;
  - (d) someter las fracciones recuperadas en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico, y
  - (e) a continuación recuperar fracciones que contienen el producto peptídico.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además alterar el pH del medio de cultivo, inmediatamente después de terminar la fermentación, a un nivel en el que se reduzca la degradación proteolítica del producto.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además la bajada de temperatura del medio de cultivo por debajo de 10 °C después de que termine la fermentación.
20. Un método de producción de un producto peptídico amidado que comprende las etapas de:
- (a) cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 3 en un medio de cultivo en el que el producto peptídico incluye una glicina en el extremo C.
  - (b) recuperar dicho producto peptídico de dicho medio de cultivo; y
  - (c) convertir dicho producto peptídico en un péptido amidado convirtiendo dicha glicina del extremo C en un grupo amino.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha conversión a un péptido amidado se consigue por:
- (a) formación de una mezcla de reacción poniendo en contacto dicho producto peptídico con oxígeno y un agente reductor en presencia de peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -amidante, o peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -hidroxilante;
  - (b) si la peptidil glicina monooxigenasa  $\alpha$ -amidante no se utiliza en la etapa (a), y si la mezcla de reacción no es aún básica, entonces aumento del pH de la mezcla de reacción hasta que sea básico; y
  - (c) recuperación de dicho péptido amidado de dicha mezcla de reacción.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la recuperación del péptido amidado comprende al menos una de las etapas seleccionadas de entre el grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía en fase inversa.
23. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 1 que sea UGL810 que tiene el Número de Registro ATCC PTA-5502.
24. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 1 que sea UGL820 que tiene el Número de Registro ATCC PTA-5569.

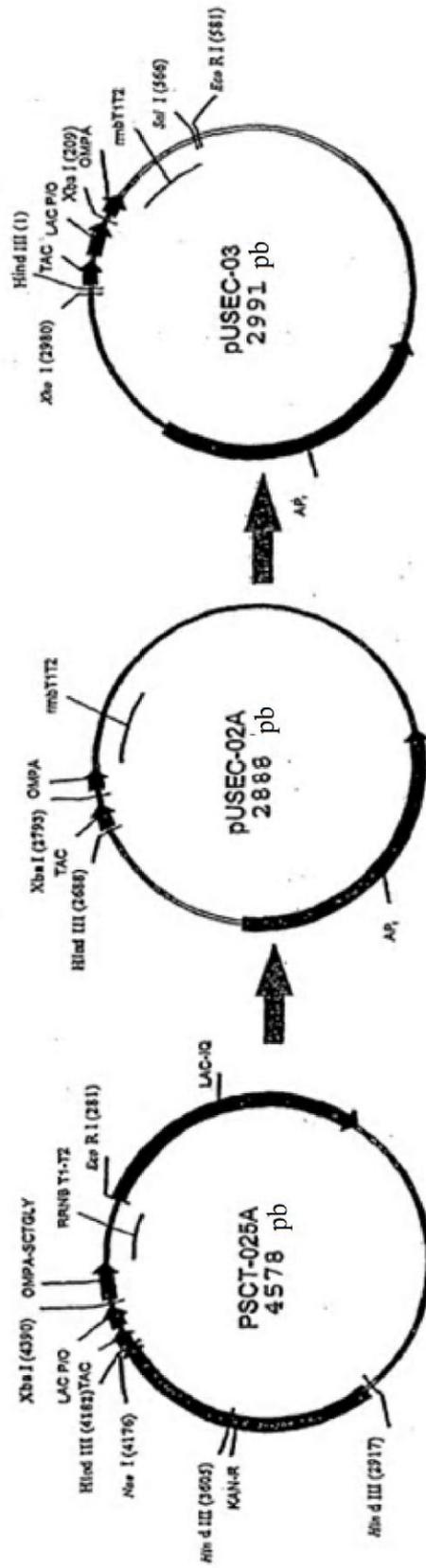


FIG. 1A



FIG. 1C

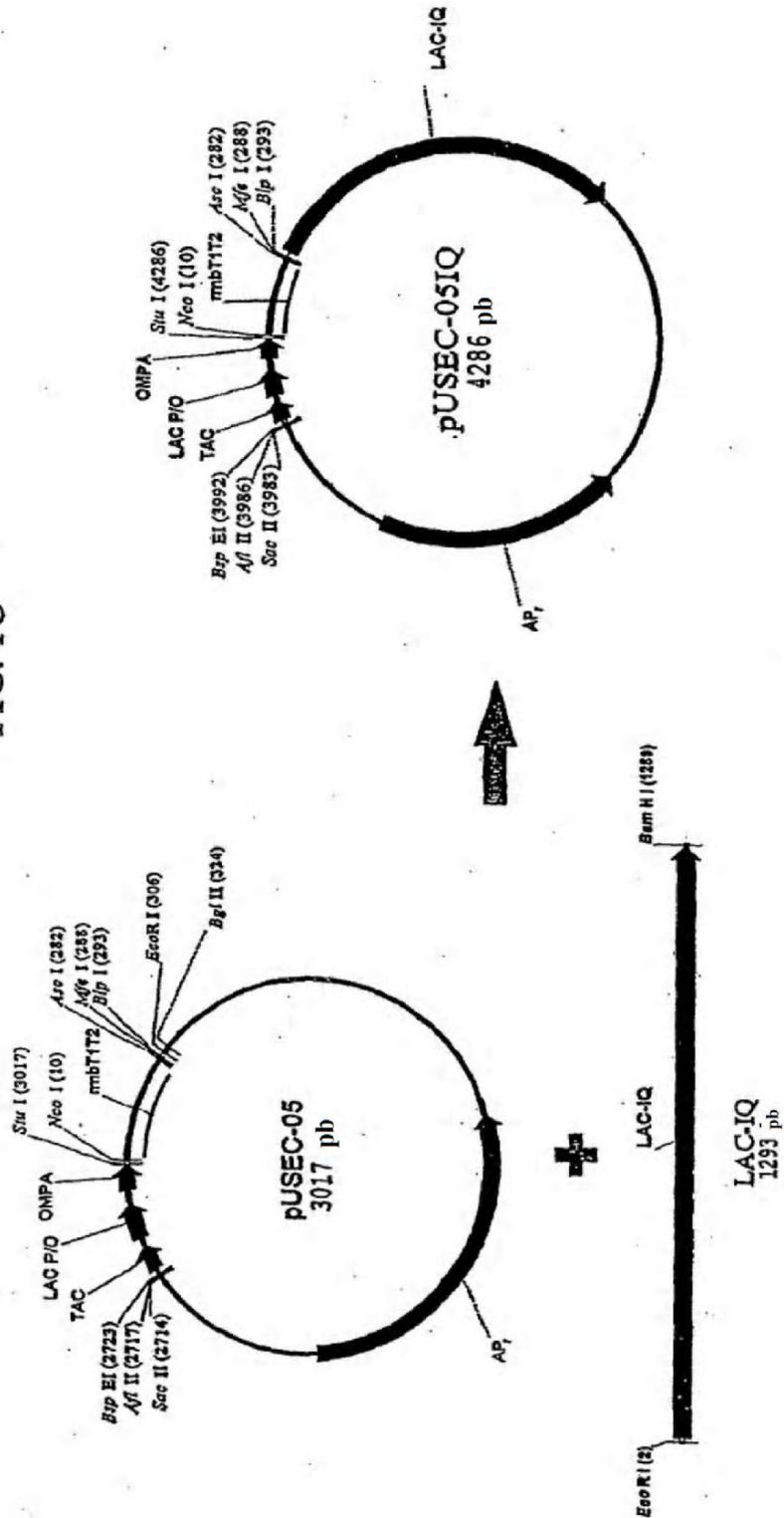
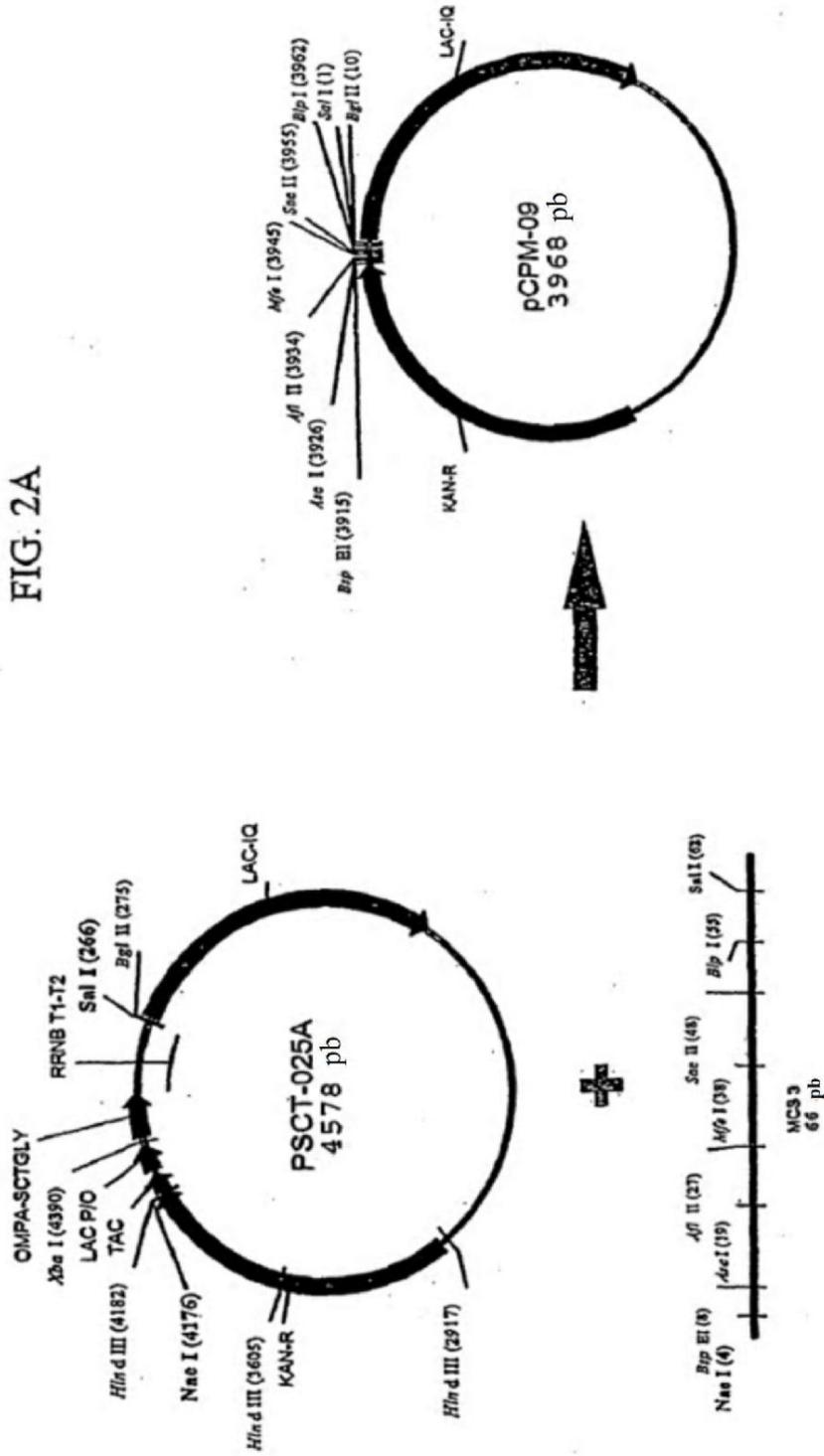


FIG. 2A



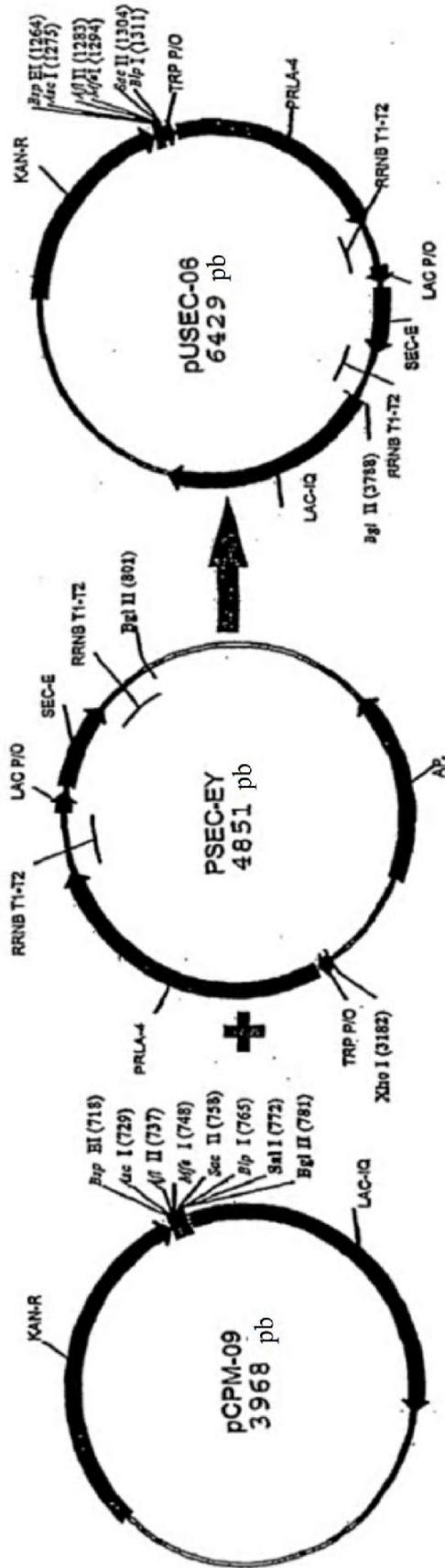
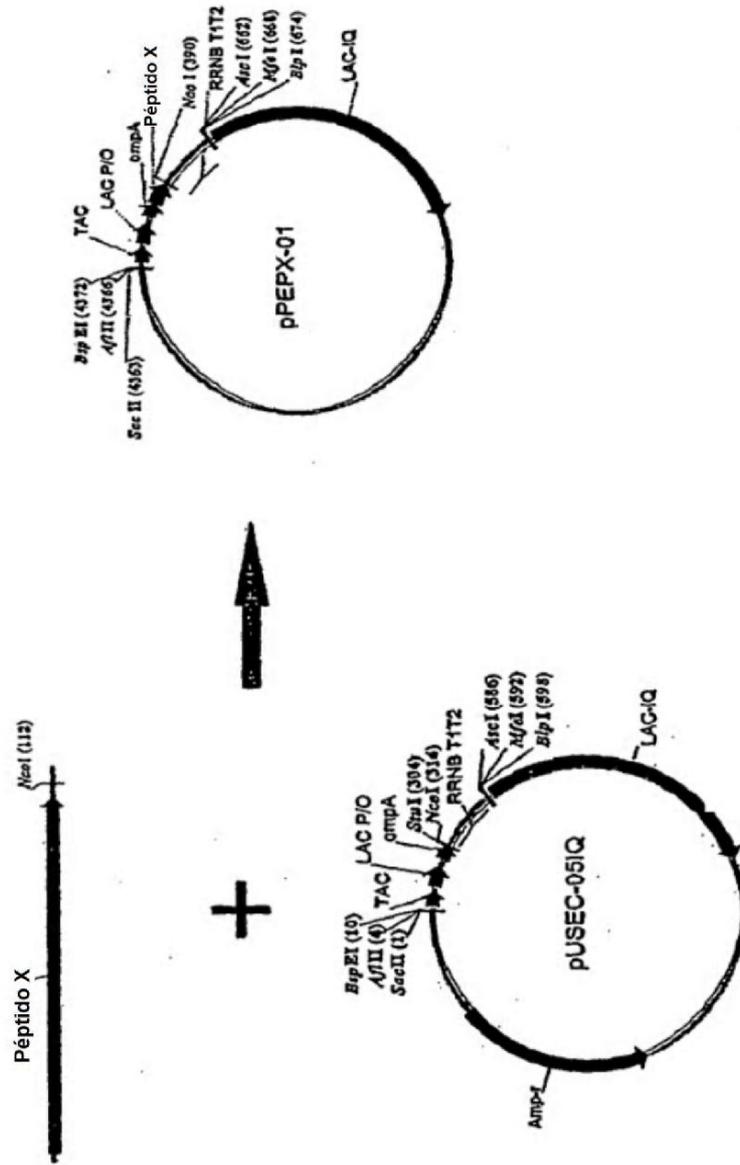


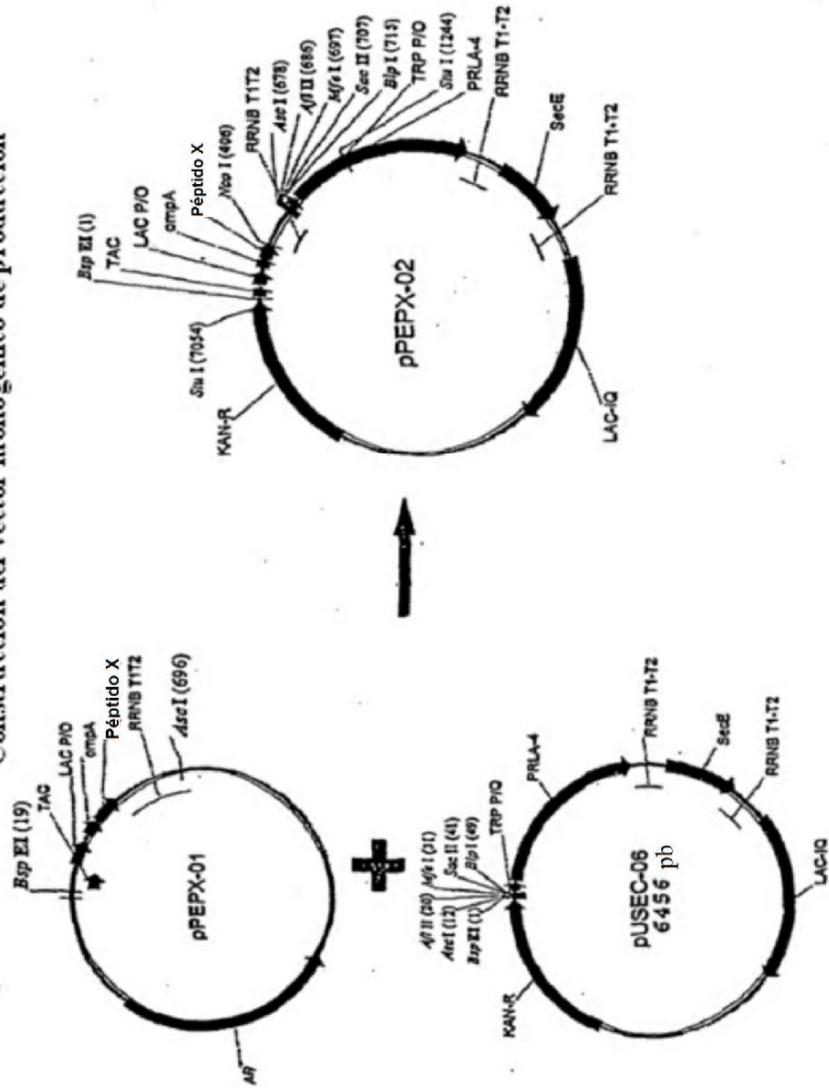
FIG. 2B

### Clonación del Péptido X Etapa 1 (Fig. 3A)

Unión del péptido X en el vector de expresión de secreción pUSEC-051Q

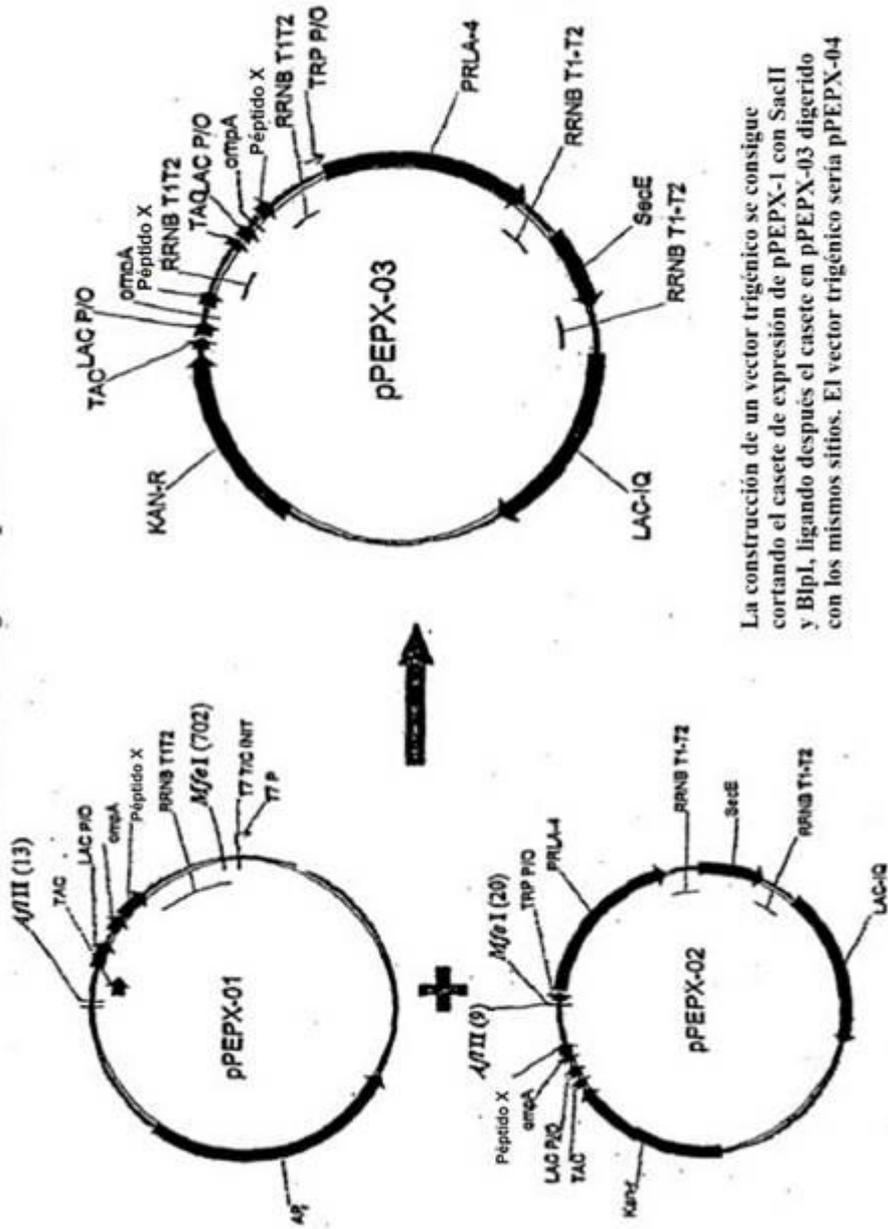


Clonación del Péptido X Etapa 2 (Fig. 3B)  
 Construcción del vector monogénico de producción



### Clonación del Péptido X Etapa 3 (Fig. 3C)

Construcción del vector digénico de producción



La construcción de un vector trigénico se consigue cortando el casete de expresión de pPEPX-1 con *Sac*II y *Bsp*I, ligando después el casete en pPEPX-03 digerido con los mismos sitios. El vector trigénico sería pPEPX-04

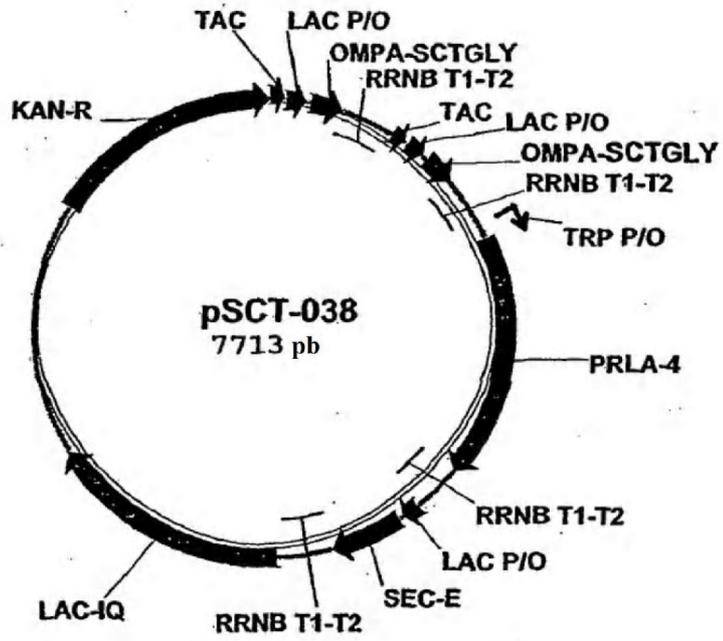


FIG. 4