

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 291**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 1/32 (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 05725198 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 1733037**

54 Título: **Proceso para la producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

11.03.2004 US 552678 P

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

22.01.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

WOON-LAM, SUSAN LEUNG y

SWARTZ, JAMES R.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 527 291 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

Proceso para la producción de polipéptidos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un proceso para la producción de un polipéptido heterólogo en *E. coli*. Más particularmente, la invención se refiere al uso de organofosfato para mejorar el rendimiento de dichos polipéptidos como se define en las reivindicaciones.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 La expresión de proteínas heterólogas por *Escherichia coli*, con la ayuda de un buen entendimiento de la biología molecular y facilidad relativa en cuanto a la manipulación genética del microorganismo, ha sido muy productiva tanto en el laboratorio como en la industria. Típicamente, para regulación de la expresión de proteínas heterólogas, se emplea un promotor inducible (por ejemplo, el promotor de la fosfatasa alcalina, el promotor *tac*, el promotor de arabinosa, etc.). La necesidad de un suceso de inducción proporciona al investigador la oportunidad de controlar el tiempo de expresión de la proteína diana. Esta capacidad es especialmente importante para aquellas proteínas heterólogas que el hospedador no tolera bien a altas concentraciones. Consiguiendo una densidad celular deseable antes de la inducción de la expresión, puede maximizarse el rendimiento volumétrico de la proteína deseada.

15 El crecimiento de las células cesa cuando se priva al microorganismo de un nutriente requerido. El componente limitante puede ser carbono, nitrógeno, fosfato, oxígeno o cualquiera de los elementos requeridos por la célula. En dichas condiciones, las células salen de la fase de crecimiento. Una manera para atenuar el cultivo de las respuestas frente al estrés producido por la limitación de nutrientes es proporcionar un suministro del componente ausente. Los suministros comunes introducidos en los procesos de fermentación semidiscontinua incluyen glucosa, aminoácidos, oxígeno, etc.

25 En el caso del fósforo (P) celular, la necesidad de aporte de fosfato no es sorprendentemente dado que el P es el quinto elemento más abundante en una célula detrás del carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno. Slanier, Adelberg e Ingraham, *The Microbial World*, 4ª ed. (Prentice Hall, NJ 1976), p. 1357. El fósforo es un componente esencial en numerosas macromoléculas tales como ácidos nucleicos, liposacáridos y lípidos de membrana. Además, su papel en los enlaces fosfoanhídrido altamente energéticos hace que sea especialmente importante en el metabolismo energético. *E. coli* es capaz de utilizar fosfato inorgánico (Pi), organofosfato o fosfonato como fuente principal de P. La captación de Pi del entorno puede realizarse a través de dos sistemas transportadores, los sistemas Pit y Pst.

30 Para los organofosfatos, la mayoría son no transportables y primero requieren hidrolizarse enzimáticamente en el periplasma antes de que el sistema (o sistemas) de transporte de Pi pueda captar el Pi liberado. Únicamente algunos organofosfatos son transportables, y el glicerol-3-fosfato (G3P) es un ejemplo de este tipo. El G3P y el glicerofosfato-1-fosfato (G1P) se conocen como alfa-glicerofosfatos. En respuesta a limitación de Pi y a la limitación de carbono, *E. coli* es capaz de captar G3P intacto disponible del medio externo en el compartimiento intracelular, donde el G3P se metaboliza para producir el fosfato o carbono necesarios. Wanner, "Phosphorus Assimilation and Control of the Phosphate Regulon", y en *Escherichia coli* y *Salmonella* Cellular y Molecular Biology, Neidhardt, ed., (segunda edición), American Society for Microbiology Press (1996), págs.1357-1365.

35 Referencias adicionales sobre el G3P son Silhavy et al., *J. Bacteriol.*, 126: 951-958 (1976) sobre la proteína periplásmica relacionada con el sistema de transporte de sn-glicerol-3-fosfato en *E. coli*; Argast et al., *J. Bacteriol.*, 136: 1070-1083 (1978) sobre un segundo sistema de transporte para sn-glicerol-3-fosfato en *E. coli*; Elvin et al., *J. Bacteriol.*, 161: 1054-1058 (1985) sobre el intercambio de Pi mediado por el sistema de transporte de G3P dependiente de *glpT*; Rao et al., *J. Bacteriol.*, 175: 74-79 (1993) sobre el efecto de las mutaciones *glpT* y *glpD* sobre la expresión del gen *phoA* en *E. coli*; y Elashvili et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2601-2608 (1998) sobre los genes *phnE* y *glpT* que potencian la utilización de organofosfatos en *E. coli* K-12. Adicionalmente, Vergeles et al., *Eur. J. Biochem.*, 233: 442-447 (1995) desvelan la alta eficacia del glicerol-2-fosfato (G2P), conocido de otra manera como beta-glicerofosfato, y el G3P como aceptores nucleotídicos en esterificaciones con fosfodiesterasa de veneno de serpiente.

40 El entendimiento actual de los dos sistemas de transporte para la captación de G3P exógeno en *E. coli*, los sistemas de transporte *Ugp* y *GlpT*, se han resumido bien en el libro *Escherichia coli* y *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology editado por Neidhardt et. al., (segunda edición), citado anteriormente, pág. 1364 en relación con las referencias 13 y 81. El operón *Ugp* pertenece al regulón *pho*. Este se induce por limitación de fosfato y se regula positivamente a través de la proteína *phoB*. El sistema *Ugp* es un sistema de transporte multicomponente dependiente de proteínas de unión periplásmicas, codificando *ugpB* la proteína de unión periplásmica, codificando *ugpA* y *ugpC* proteínas de canales de membrana integrales y codificando *ugpC* la ATPasa. *GlpT* es parte del

sistema *glp* que media la captación y el metabolismo de glicerol, G3P, y fosfodiésteres de glicerol fosforilo (Lin et al., Annu. Rev. Microbiol., 30: 535-578 (1976); capítulo 20; págs. 307-342 Dissimilatory Pathways for sugars, polyols and carboxylates. Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, segunda edición).

5 Este Sistema de transporte es un intercambiador aniónico que se sabe que media la salida de Pi del citoplasma por intercambio con G3P externo. En una cepa de tipo silvestre que crece en G3P, aunque las células que toman G3P liberan poco Pi mediante el sistema Ugp, el Pi puede liberarse en el periplasma cuando el G3P se toma mediante el sistema GlpT. Si como resultado de una afluencia mediada por *glpT* permeasa, se libera una cantidad represiva de Pi, se cortará la actividad del regulón *pho*, incluido el sistema Ugp. En determinadas condiciones, GlpT es la única vía para la salida de Pi de la célula por intercambio con G3P externo. Elvin et al., J. Bacteriol., 161: 1054-1058 (1985); Rosenberg, "Phosphate transport in prokaryotes," p. 205-248. In B. P. Rosen and S. Silver (ed.), Ion Transport in Prokaryotes (Academic Press, Inc., Nueva York, 1987).

15 Cuando se comparan las capacidades de los sistemas Ugp y GlpT con el transporte de G3P, las velocidades máximas de los dos sistemas son similares. La afinidad aparente para G3P es mayor con el Sistema Ugp que con el Sistema GlpT. Posiblemente, ambos sistemas podrán aportar suficiente G3P para el crecimiento celular si se encuentran disponibles en el medio de crecimiento. Sin embargo, el G3P transportado exclusivamente mediante el Sistema Ugp puede servir como la única fuente de fosfato pero no de carbono, mientras que el G3P transportado por GlpT puede servir como la única fuente para ambos (Schweizer et al., J Bacteriol., 150: 1154-1163 (1982)). Los dos genes *ugp* que codifican el sistema de transporte de G3P dependiente del regulón *pho* se han mapeado (Schweizer et al., J. Bacteriol., 150: 1164-1171 (1982)), la región *ugp* que contiene estos genes se ha caracterizado (Schweizer et al., Mol. and Gen. Genetics, 197: 161-168 (1984)), y se ha estudiado la regulación del operón *ugp* (Schweizer et al., J. Bacteriol., 163: 392-394 (1985); Kasahara et al., J. Bacteriol., 173: 549-558 (1991); Su et al., Molecular & General Genetics, 230: 28-32 (1991); Brzoska et al., "ugp-dependent transport system for sn-glycerol 3-phosphate of Escherichia coli," p. 170-177 in A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987); Brzoska et al., J. Bacteriol., 176: 15-20 (1994); y Xavier et al., J. Bacteriol., 177: 699-704 (1995)).

25 En cepas de tipo silvestre, existe un conjunto intracelular estable de G3P y se mantiene a aproximadamente 200 µM. Internamente, el G3P puede sintetizarse en G3P a través de la conversión enzimática del glicerol por la glicerol quinasa (codificada por *glpK*) cuando se desarrolla en glicerol como única fuente de carbono, o a partir de la reducción del producto intermedio glucolítico, la dihidroxiacetona fosfato, por la G3P sintasa, el producto génico del gen *gpsA*, durante el desarrollo en fuentes de carbono distintas de glicerol. Dado que el G3P es un producto intermedio importante que forma la estructura de todas las moléculas fosfolipídicas, los glicerolfosfatos internos también pueden generarse a partir de la degradación de fosfolípidos y triacilglicerol. Como metabolito, el G3P interno puede canalizarse en la ruta biosintética de fosfolípidos u oxidarse a través de la G3P deshidrogenasa para formar dihidroxiacetona fosfato y suministrarse en la ruta glucolítica.

35 En situaciones en las que para regular la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, se emplee el promotor de AP, dado que la inducción solo se produce después del empobrecimiento de Pi del medio, las células inducidas por la actividad del promotor de AP se encuentran típicamente sin fosfato y en un estado de salud decadente. Estas pueden tener que eliminar el fosfato necesario para las funciones celulares. Las posibles consecuencias de dicha eliminación de fosfato pueden incluir renovación de ribosomas, energéticas celulares más bajas y mayor expresión de proteasas y proteólisis (St. John and Goldberg, J. Bacteriol., 143: 1223-1233 (1980)), posiblemente conduciendo a células menos sanas con capacidad reducida para la acumulación de proteínas.

45 Mejorando el estado metabólico de *E. coli* posiblemente puede aumentarse la capacidad de la célula para sintetizar proteínas. Si se suministra fosfato despacio, las células también pueden detectar una baja concentración de P_{ii} en el periplasma, induciendo de esta manera el regulón *pho* sin privar intracelularmente el átomo de P (véase la Patente de Estados Unidos. N° 5.304.472). Existe una necesidad de mejorar métodos adicionales de producción de polipéptidos heterólogos en *E. coli*.

Sumario de la invención

50 En la invención del presente documento, se proporciona un proceso para producir y aumentar los rendimientos de polipéptidos heterólogos en *E. coli*, como se define en las reivindicaciones. El suministro de organofosfato transportable tal como una alfa-glicerofosfato a diversos hospedadores de *E. coli*, incluyendo aquellos con y sin el gen *glpT* de tipo silvestre y aquellos con y sin el gen *phoA* de tipo silvestre, tal como, por ejemplo, (*UGP + ΔglpT phoA*) de *E. coli*; se muestra para mejorar la expresión de proteínas heterólogas a escala tanto en matraces agitadores como en fermentadores de 10 l, y se espera que se realice de manera similar a mayor escala, tal como a 10.000 l. El beneficio del rendimiento del producto se observó a través de sistemas de modelo múltiple que emplearon diversos promotores, incluyendo promotores inducibles tales como el promotor *tac*, T7 o AP, para la expresión de las proteínas heterólogas. Una ventaja adicional es que el producto puede obtenerse anteriormente en la fase de crecimiento activo, es decir, en un periodo de tiempo más corto en comparación con cualquier otra manera. En determinadas realizaciones, puede obtenerse más producto anteriormente en la fase de crecimiento activo para mejorar significativamente la productividad.

- Por consiguiente, la presente invención es como se reivindica. Un aspecto la presente invención proporciona un proceso para producir un polipéptido heterólogo en *E. coli* que comprende (a) cultivar células de *E. coli* que comprendan ácido nucleico que codifique el polipéptido en un medio de cultivo alimentando al mismo tiempo el medio de cultivo con un organofosfato transportable, de tal manera que se exprese el ácido nucleico; y (b) recuperar el polipéptido de las células, en el que el organofosfato se selecciona del grupo que consiste en alfa-glicerofosfato, un beta-glicerofosfato, una mezcla de glicerol-2-fosfato y glicerol-3-fosfato, y glicerol-3-fosfato solo, y en el que durante la etapa de cultivo se añade un fosfato inorgánico al medio de cultivo. En un aspecto preferido, el cultivo se produce en un matraz agitador o fermentador, preferentemente en un fermentador. En otra realización preferida, el polipéptido se recupera del citoplasma, periplasma, o medio de cultivo de las células. También se prefiere que la expresión del ácido nucleico se regule por un promotor inducible, tal como el promotor de la fosfatasa alcalina, el promotor *tac*, o el promotor T7, y en el que preferentemente la expresión del ácido nucleico comienza al mismo tiempo que la fase de crecimiento activo de la etapa de cultivo. En una realización, la *E. coli* es de tipo silvestre. En otra realización, la *E. coli* carece de *glpT* cromosómico y de *phoA* cromosómico, pero preferentemente no carece de *ugp* cromosómico.
- 15 Sin limitarse a ninguna otra teoría, se cree que en este proceso los compuestos de organofosfato transportables se suministran a las células de tal manera que el aporte de fosfato no se detectará por el *psfS* del sistema Pho sino que seguirá proporcionando fosfato después de la degradación en el citoplasma, y adicionalmente de tal manera que el suministro de organofosfato transportable, tal como G3P, enriquezca posiblemente a las células con un producto intermedio metabólico utilizable que pueda suministrarse fácilmente en rutas metabólicas importantes.
- 20 Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra la expresión de un fragmento de anticuerpo de llama secretado en un hospedador de *E. coli* BL21 usando el promotor *tac* en un cultivo con matraz agitador, utilizando agua o G3P 200 mM como un complemento en medio con bajo contenido en fosfato (CRAP) o con alto contenido en fosfato (THCD).
- 25 La Figura 2 muestra la expresión de Apo2L citoplasmático en un hospedador de *E. coli* HMS174 usando el promotor T7 en un cultivo con matraz agitador utilizando agua o G3P 200 mM como un complemento en medio CRAP.
- La Figura 3 muestra el efecto de la alimentación con G3P durante la fermentación sobre la acumulación de IGF-1 secretado a lo largo del tiempo. Este utiliza un hospedador de *E. coli* de tipo silvestre, el promotor AP, y alimentación continuada de glucosa.
- 30 La Figura 4 muestra el efecto de una mutación de *glpT* y alimentación con G3P durante la fermentación sobre la acumulación de IGF-1 secretada a lo largo del tiempo. Este usa un hospedador de *E. coli* $\Delta glpT$, el promotor AP y diversos índices de alimentación con G3P.
- La Figura 5 muestra el diagrama de pAPo2-P2RU plasmídico.
- 35 La Figura 6 muestra la secuencia nucleotídica del ADNc del ligando Apo-2 humano (SEC ID N°: 1) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N° 2). La "N" en la posición del nucleótido 447 (en la SEC ID N°: 1) se usa para indicar que la base nucleotídica puede ser una "T" o una "G".
- La Figura 7 muestra el efecto de la alimentación con G3P sobre la acumulación específica de Apo2L en el hospedador de *E. coli* $\Delta glpT$ (43F6), con tres índices de alimentación diferentes y un control sin alimentación con G3P.
- 40 La Figura 8 muestra el beneficio sobre la acumulación total específica de Apo2L de la alimentación con glicerofosfato sobre fosfato inorgánico al hospedador *glpT* de tipo silvestre (43E7), en el que la densidad celular aumenta por encima de una DO550 de 200.
- La Figura 9 muestra el efecto del reemplazo de fosfato inorgánico con glicerofosfato sobre la acumulación total específica de Apo2L en el hospedador de *E. coli* *glpT* de tipo silvestre (43E7) y el hospedador de *E. coli* $\Delta glpT$ (43F6).
- 45 La Figura 10 muestra el efecto del reemplazo de alfa-glicerofosfato con una mezcla 50:50 de alfa y beta-glicerofosfato como suministro sobre la acumulación de Apo2L total, frente a un control sin alimentación, en un hospedador de *E. coli* $\Delta glpT$ (6IG1).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y a proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Los polipéptidos "heterólogos" son aquellos polipéptidos extraños a la célula hospedadora que se está utilizando, tal como una proteína humana producida por *E. coli*. Aunque el polipéptido puede ser procariota o eucariota, preferentemente es eucariota, más preferentemente de mamífero y más preferentemente de ser humano.

Los ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen moléculas tales como, por ejemplo, renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humano o la hormona de crecimiento bovino; factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; antitripsina 1; cadena de insulina A; cadena de insulina B; proinsulina; trombotopoyetina; hormona estimuladora de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y el factor de von Willebrand; y factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético auricular; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; anticuerpos contra el dominio (o dominios) ErbB2, tales como 2C4 (documento WO 01/00245; hibridoma ATCC HB-12697), que se unen a una región en el dominio extracelular de ErbB2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 584 de ErbB2, inclusive); encefalinasa; sustancia inhibidora muleriana; cadena de relaxina A; cadena de relaxina B; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o de factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF; cardiotrofinas (factor hipertrófico cardiaco) tal como cardiotrofina-1 (CT-1); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-1, TGF 2, TGF 3, TGF-4, o TGF-5; factor de crecimiento similar a insulina I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1,3)-IGF-I (IGF-I cerebral); proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína ósea morfogenética (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humana (HSA) o albúmina de suero bovina (BSA); factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; anti-anticuerpo anti-HER-2; ligando Apo2 (Apo2L); superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígenos virales tales como, por ejemplo, una parte de la envoltura del SIDA; proteínas transportadoras; receptores autoguiados; adreínas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los polipéptidos de interés preferidos incluyen polipéptidos tales como HSA, BSA, anti-IgE, anti-CD20, anti-IgG, t-PA, gp120, anti-CD11a, anti-CD18, 2C4, anti-VEGF, VEGF, TGF-beta, activina, inhibina, anti-HER-2, DNasa, IGF-I, IGF-II, IGF-I cerebral, hormona de crecimiento, cadenas de relaxina, factor liberador de hormona de crecimiento, cadenas de insulina o pro-insulina, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, NGF, NT-3, BDNF, Apo2L, y uroquinasa. El polipéptido es más preferentemente IGF-I o Apo2L.

Las expresiones "ligando Apo2", "Apo2L" y "TRAIL" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una secuencia polipeptídica que incluye los restos de aminoácidos 114-281, inclusive, los restos 95-281, inclusive, los restos 92-281, inclusive, los restos 91-281, inclusive, los restos 41-281, inclusive, los restos 15-281, inclusive, o los restos 1-281, inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 (SEC ID N° 2), así como fragmentos biológicamente activos, y variantes de delección, inserción, o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los restos 114-281 de la Figura 6 (SEC ID N° 2). Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende los restos 92-281 o los restos 91-281 de la Figura 6 (SEC ID N° 2). Los polipéptidos Apo2L pueden codificarse por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la Figura 6 (SEC ID N° 1). Opcionalmente, el codón que codifica el resto de Pro119 (Figura 6; SEC ID N° 1) puede ser "CCT" o "CCG". En otra realización preferida, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90 %, e incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %, con una cualquiera de las secuencias anteriores. La definición incluye variantes sustitucionales del ligando Apo2 en las que al menos uno de sus aminoácidos nativos se sustituye por un resto de alanina. La definición también incluye un ligando Apo2 de secuencia nativa aislado de una fuente de ligando Apo2 o preparado por métodos recombinantes o sintéticos. El ligando Apo2 incluye los polipéptidos denominados ligando Apo2 o TRAIL desvelados en los documentos WO 97/01633, WO 97/25423 y WO 01/00832. Las expresiones "ligando Apo2" y "Apo2L" se usan para referirse en general a formas del ligando Apo2 que incluyen formas monoméricas, diméricas o triméricas del polipéptido. Toda la numeración de los restos de aminoácidos a los que se hace referencia en la secuencia Apo2L usa la numeración de acuerdo con la Figura 6 (SEC ID N° 2) a menos que se indique específicamente otra cosa. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refiere al resto de ácido aspártico en la posición 203 en la secuencia proporcionada en la figura 6 (SEC ID N° 2).

La expresión " dominio extracelular del ligando Apo-2 " o "DEC del ligando Apo2" se refiere a una forma del ligando Apo2 que carece esencialmente de dominios transmembrana y citoplasmáticos. Habitualmente, el DEC tendrá menos del 1 % de dichos dominios transmembrana y citoplasmáticos, y preferentemente tendrá menos del 0,5 % de dichos dominios. "Biológicamente activo" o "actividad biológica", en relación con Apo2L, se refiere a (a) tener la capacidad de inducir o estimular la apoptosis en al menos un tipo de célula cancerosa de mamífero o célula viralmente infectada *in vivo* o *ex vivo*; (b) ser capaz de suscitar un anticuerpo (es decir ser inmunogénico); (c) ser capaz de unirse y/o estimular a un receptor de Apo2L; o (d) conservar la actividad de un polipéptido Apo2L nativo o de origen natural.

La expresión "secuencias control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma.

El ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una pre-secuencia o líder secretor está ligado operativamente al ADN de un polipéptido si éste se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está ligado operativamente a una secuencia codificante si este afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante si está posicionado para que facilite la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. El ligamiento se realiza por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, pueden usarse adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas dichas designaciones incluyen descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas", incluyen células y cultivos primarios del sujeto derivados del mismo sin importar el número de transferencias. También se entenderá que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o la actividad biológica que la explorada en las células originalmente transformadas. Cuando se propongan diferentes nombres, se aclarará en el contexto.

El término "organofosfato", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto de fosfato que contiene uno o más átomos de carbono, que también puede contener átomos de haluro. Dicho compuesto de fosfato puede ser tal que pueda suministrarse al, y utilizarse por, el cultivo celular. Con frecuencia estos compuestos se usan como pesticidas. Los organofosfatos "transportables" pueden transportarse desde el medio externo de la célula al interior de la célula sin tener que hidrolizarse previamente en modo alguno. Si una cepa de *E. coli* no se desarrolla bien con un organofosfato, la utilización de dicho organofosfato puede potenciarse sobreexpresando en *E. coli* el producto génico *phnE*. Dicho gen confiere el fenotipo de utilización espontánea de organofosfato a la cepa de *E. coli* después de la transformación. Véase Elashvili et al., citado anteriormente. Ejemplos de organofosfatos adecuados incluyen alfa-glicerofosfatos tales como glicerol-1-fosfato y glicerol-3-fosfato, y beta-glicerofosfato (glicecol-2-fosfato), prefiriéndose el glicerol-2-fosfato y/o el glicerol-3 fosfato, y una mezcla de glicerol-2 y glicerol-3-fosfato o prefiriéndose en el presente documento más particularmente el uso de glicerol-3-fosfato. Como se usa en el presente documento, el término "G3P" sin estar en una mezcla o "G3P solo" se refiere a una composición que contiene al menos aproximadamente 80 % de glicerol-3-fosfato; pudiendo contener esta hasta aproximadamente 20 % de impurezas tal como G2P. Una mezcla de G3P y G2P contendría menos de aproximadamente 80 % de G3P.

Un fosfato inorgánico es un compuesto de fosfato que no contiene ningún átomo de carbono, asociándose típicamente el fosfato con un metal alcalino o alcalinotérreo tal como potasio, calcio, magnesio o fosfato de sodio.

"Fase de crecimiento activo" se refiere a la fase de la etapa de cultivo en la que las células crecen activamente y no a células que están muy limitadas de nutrientes, tales como aquellas que están en fase estacionaria.

Modos para realizar la invención

La presente invención proporciona un método para producir polipéptidos heterólogos en *E. coli* como se define en las reivindicaciones. En este método las células de *E. coli* que comprenden ácido nucleico que codifica el polipéptido se cultivan en un medio de cultivo alimentando al mismo tiempo el medio de cultivo con un organofosfato transportable como se define en las reivindicaciones, de tal manera que se exprese el ácido nucleico. Después, el polipéptido se recupera de las células. La recuperación puede ser del citoplasma, periplasma, o del medio de cultivo de las células. El cultivo puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado, preferentemente en un matraz agitador o un fermentador, más preferentemente, en un fermentador.

Los parámetros de cultivo se usan y la producción del polipéptido puede realizarse de una manera convencional, tal

como los procedimientos descritos más adelante.

A. Selección de ácido nucleico y sus modificaciones

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés es adecuadamente ARN, ADNc o ADN genómico de cualquier fuente, siempre que codifique el polipéptido (o polipéptidos) de interés. Se conocen bien métodos para seleccionar el ácido nucleico apropiado para la expresión de polipéptidos heterólogos (incluyendo sus variantes) en *E. coli*.

Si van a producirse anticuerpos monoclonales, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transforman en las células hospedadoras bacterianas del presente documento para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

En la técnica se han descrito métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que típicamente se extraen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1998)), sustituyendo secuencias de regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N.º. 4.816.567) en el que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Por consiguiente, en el método denominado "más adecuado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta después como la región marco conservada (FR, *framework*) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma región marco conservada para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es también importante que los anticuerpos se humanicen conservando elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son conocidos para los expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar el posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de la FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de secuencias receptoras e importadas de manera que puede obtenerse la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión antigénica.

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes diana para generar un inmunocombinado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el especialista en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de

elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos Nos 5.571.894 y 5.587.458). El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

5 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes de la misma proteína. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos). Estos pueden estar en forma de fusiones de diversas cadenas de anticuerpo o en forma de una cadena. Una cadena pesada puede ser de por sí competente

10 En una estrategia para producir anticuerpos biespecíficos, una inmunoadhesina biespecífica se prepara introduciendo en una célula hospedadora secuencias de ADN que codifican una primera fusión que comprende un primer dominio de unión fusionado con una secuencia de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina que carece de un sitio de unión a cadena ligera; una segunda fusión que comprende un segundo dominio de unión fusionado a una secuencia de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina que conserva un sitio de
15 unión a cadena ligera; y una cadena ligera de inmunoglobulina, respectivamente. Las células hospedadoras se cultivan después para expresar las secuencias de ADN para producir una mezcla de: (i) un heterotrímero que comprende la primera fusión ligada covalentemente con un segundo par de cadena ligera de inmunoglobulina; (ii) un heterotetrámero que comprende dos pares de cadena ligera de inmunoglobulina ligados a la segunda fusión; y (iii) un homodímero que comprende dos moléculas ligadas covalentemente con la primera fusión. La mezcla de
20 productos se elimina del cultivo celular y el heterotrímero se aísla de los otros productos. Esta estrategia se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros
25 que se recupera del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar con respecto a una o más cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han
35 propuesto, por ejemplo, contra células del sistema inmunitario diana contra células indeseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquiera de los métodos de entrecruzamiento convenientes. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con diversas técnicas de entrecruzamiento.

En la bibliografía también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito sódico, agente formador de
45 complejos de ditiol, para estabilizar ditiolos adyacentes e impedir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte después en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

50 Adicionalmente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Shalaby et al, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)).

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos producidos usando cremalleras de leucina (Kostelny et al, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligan a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión
55 génica. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región bisagra para formar monómeros y después se oxidan para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

90: 6.444-6.448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se obligan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión antigénica. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv) (Gruber et al, J. Immunol., 152: 5368 (1994)).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos (Tutt et al, J. Immunol, 147: 60 (1991)).

10 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes polipeptídicas se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis con PCR, o mutagénesis con casete de una variante anteriormente preparada o una versión no variante del polipéptido.

15 Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la unión del receptor Fc. Esto puede realizarse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el resto (o restos) de cisteína puede introducirse en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región.

20 Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.739.277. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del aumento *in vivo* de la semivida en suero de la molécula de IgG.

25 En el presente documento se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a una de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

B. Inserción de Acido Nucleico en un Vector Replicable

30 El ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) se inserta adecuadamente en un vector replicable para la expresión en *E. coli* bajo el control de un promotor adecuado. Para esta finalidad se dispone de muchos vectores y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y de la célula hospedadora particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de la célula hospedadora particular con la que es compatible. Dependiendo del tipo de hospedador particular, los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un promotor, y una

35 secuencia de terminación de la transcripción.

En general, en relación con hospedadores de *E. coli*, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias replicón y control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora. Normalmente el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolivar et al, Gene, 2: 95 (1977)). pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina y por tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, u otro plásmido bacteriano o fago, también contiene generalmente, o está modificado para que contenga, promotores que puede usar el hospedador de *E. coli* para la expresión de los genes de selección marcadores.

(i) Componente de Secuencia Señal

45 El ADN que codifica el polipéptido de interés del presente documento puede expresarse no solo directamente, sino también como una fusión con otro polipéptido, preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N del polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser una que reconociese y procesase (es decir, escindiese una

50 peptidasa señal) la célula hospedadora.

Para las células hospedadoras procariontes que no reconocen y procesan la secuencia de señal polipeptídica nativa o eucariota, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionte, seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable.

(ii) Origen del Componente de Replicación

Los vectores de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas por diversas bacterias. El origen de replicación a partir del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*.

(iii) Componente Génico de Selección

Los vectores de expresión generalmente contienen un gen de selección, denominado también marcador de selección. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células hospedadoras transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Este marcador de selección es distinto de los marcadores genéticos utilizados y definidos por la presente invención. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan déficits auxotróficos distintos de los ocasionados por la presencia del marcador (o marcadores) genético, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco que detiene el crecimiento de una célula hospedadora. En este caso, aquellas células que se transforman satisfactoriamente con el ácido nucleico de interés producen un polipéptido que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina (Southern et al, J. Molec Appl Genet, 1: 327 (1982)); ácido micofenólico (Mulligan et al, Science, 209: 1422 (1980)), o higromicina (Sugden et al, Mol Cell Biol., 5: 410-413 (1985)). Los tres ejemplos proporcionados anteriormente emplean genes bacterianos bajo control eucariota para transmitir resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (genética), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente.

(iv) Componente Promotor

El vector de expresión para la producción del polipéptido de interés contiene un promotor adecuado que reconoce *E. coli* y está ligado operativamente al ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Promotores adecuados para su uso con hospedadores *E. coli* incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa (Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)); el sistema promotor de arabinosa (Guzman et al, J. Bacteriol., 174: 7716-7728 (1992)), alcalina fosfatasa, el promotor de T7, un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)) y EP 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* (deBoer et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 80: 21-25 (1983)). Sin embargo, también son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, lo que permite a un especialista en la técnica ligarlas operativamente al ADN que codifica el polipéptido de interés (Siebenlist et al, Cell, 20: 269 (1980)) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción necesario.

Preferentemente, el promotor empleado en el presente documento es un promotor inducible, es decir, uno que está activado mediante un agente inductor o condición inductora (tal como empobrecimiento de fosfato periplásmico). Dichos promotores inducibles preferidos en el presente documento son el promotor de la fosfatasa alcalina, el promotor *tac*, o el promotor T7.

Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor puede retirarse del ADN de la fuente bacteriana por digestión con enzimas de restricción e insertarse en el vector que contiene el ADN deseado.

(v) Construcción y Análisis de Vectores

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes mencionados anteriormente emplea técnicas de ligamiento convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y vuelven a ligarse en forma deseada para generar el plásmido necesario.

Para el análisis de confirmación de secuencias correctas en plásmidos construidos, se usan mezclas de ligamiento para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446) u otras cepas, y los transformantes satisfactorios se seleccionan por resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando sea apropiado. Los plásmidos para los transformantes se preparan, se analizan por digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian por el método de Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 74: 5463-5467 (1977) o Messing et al, Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981) o por el método de Maxam et al, Methods in Enzymology, 65: 499 (1980).

C. Selección y Transformación de Células Hospedadoras

5 Las células de *E. coli* adecuadas como hospedadores parentales para la expresión de plásmidos del presente documento incluyen *E. coli* W3110 (ATCC 27325), *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC 31537). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Las células mutantes de cualquiera de las cepas mencionadas anteriormente también pueden emplearse como hospedadores de partida que después se mutan adicionalmente para que contengan al menos el genotipo mínimo requerido en el presente documento. La cepa de *E. coli* W3110 es un hospedador parental preferido porque es una cepa hospedadora habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. En la siguiente tabla se incluyen ejemplos de hospedadores de *E. coli* de partida a usar como hospedadores parentales, junto con sus genotipos:

Cepa	Genotipo
W3110	K-12 F lambda <i>IN(rrnD-rrnE)1</i>
1A2	<i>AfhuA (AtonA)</i>
9E4	<i>AfhuA (AtonA) ptr3</i>
27A7	<i>AfhuA (AtonA) ptr3 phoAAE15 (argF-lac)169</i>
27C6	<i>AfhuA (AtonA) phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 ompT A(nmpc-fepE)</i>
27C7	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) <i>phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 degP41::kanR ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>)
33D3	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) <i>ptr3 lacIq lacL8 ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>degP::kanR</i>
36F8	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>ton4</i>) <i>phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 degP41::kanR ilvG+</i>
43D3	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) <i>phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 degP41::kanR ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>ilvG+</i>
43E7	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) <i>phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 degP41 ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>ilvG+</i>
43F6	<i>AfhuA (AtonA) phoAAE15 (argF-lac)169 ptr3 degP41::kanR ompTA(nmpc-fepE) A(rbs7) ilvG+AglpT596</i>
44D6	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) (<i>argF-lac</i>)169 <i>ptr3 degP41::kanR ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>ilvG+</i>
45F8	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) (<i>argF-lac</i>)169 <i>ptr3 degP41 ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>ilvG+ phoS(T10Y)</i>
45P9	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) (<i>argF-lac</i>)169 <i>ptr3 degP41 ompT</i> Δ (<i>nmpc-fepE</i>) <i>ilvG+ phoS(T10Y) cyo::kanR</i>
61G1	<i>AfhuA Aprtr AompT AdegP AphoA ilvG+ AglpTQ</i>

10

También son adecuados los productos intermedios en la elaboración de la cepa 36F8, es decir, 27B4 (Patente de Estados Unidos N° 5.304.472) y 35E7 (una aislado de colonias espontáneo resistente a temperatura que crece mejor que 27B4). Una cepa adicional adecuada es la cepa de *E. coli* que tiene una o más proteasas periplásmicas mutantes desvelada en la Patente de Estados Unidos. N° 4.946.783 expedida el 7 de agosto de 1990.

15 En una realización, la célula hospedadora de *E. coli* empleada es de tipo silvestre con respecto a o en referencia al gen *glpT*, tal como 43E7, o carece del gen *glpT*, tal como 43F6 o 61G1. En otra realización, la cepa hospedadora de *E. coli* empleada es de tipo silvestre con respecto a o en referencia al gen *phoA*. En una realización preferida, la *E. coli* carece de *phoA* cromosómico. En otra realización preferida, la *E. coli* carece de *glpT* cromosómico y *phoA* cromosómico. En una realización más preferida, la *E. coli* carece de *glpT* cromosómico y *phoA* cromosómico, pero no de *ugp* cromosómico. Dicho hospedador de *E. coli* mutante más preferido es 43F6 o 61G1, cuyos genotipos se proporcionan en la tabla anterior. Como se usa en el presente documento, "tipo silvestre con respecto a *glpT* se refiere a hospedadores de *E. coli* que son células *glpT+* o *glpT* competentes, es decir, aquellas que no carecen de *glpT* cromosómico. De manera similar, como se usa en el presente documento, "tipo silvestre con respecto a *phoA*" se refiere a hospedadores de *E. coli* que son células *phoA+* o *poa* competentes es decir, aquellas que no carecen de *phoA* cromosómico.

25

Las cepas pueden producirse por integración cromosómica de la cepa parental u otras técnicas, incluyendo aquellas establecidas en los ejemplos indicados más adelante.

5 El ácido nucleico que codifica los polipéptidos se inserta en las células hospedadoras. Preferentemente, esto se realiza transformando las células hospedadoras con los vectores de expresión descritos anteriormente y cultivando en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir los diversos promotores.

10 Transformación significa introducir ADN en un organismo de tal manera que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), se usa generalmente para células procariontas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO, como describen Chung y Miller, Nucleic Acids Res., 16: 3580 (1988). Otro método adicional es el uso de la técnica denominada electroporación.

D. Cultivo de Células Hospedadoras

15 Las células de *E. coli* usadas para producir el polipéptido de interés se cultivan en medios adecuados como se describe en líneas generales en Sambrook et al., citado anteriormente. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán obvias para el experto habitual en la técnica.

20 Las células se cultivan al mismo tiempo que el medio de cultivo se alimenta con un organofosfato transportable tal como alfa-glicerofosfato y/o beta-glicerofosfato, y especialmente glicerol-2-fosfato y/o glicerol-3-fosfato. El cultivo puede tener lugar en un matraz agitador o en un fermentador, preferentemente en un fermentador. El polipéptido se recupera preferentemente del citoplasma, periplasma, o medio de cultivo de las células.

25 En el proceso de esta invención, la expresión del ácido nucleico puede comenzar en cualquier fase de la etapa de cultivo. Sin embargo, preferentemente, la expresión del ácido nucleico comienza al mismo tiempo que la densidad celular está aún aumentando. Esto podría realizarse mediante la inducción del promotor con el inductor o condición inductora apropiado antes de que cese el crecimiento celular.

30 La velocidad de alimentación del organofosfato en el medio de cultivo a emplear para la producción máxima del polipéptido depende de muchos factores, incluyendo el tipo de organofosfato, la concentración de organofosfato, el tipo de polipéptido que va a producirse, el tipo de promotor, la cepa de la célula hospedadora empleada, y la densidad celular en el caldo de cultivo. Si el polipéptido es IGF-I y el organofosfato es el glicerol-3-fosfato destinado para ampliar la duración de la producción, en las condiciones de cultivo descritas y usando un proceso de 10-L, la velocidad de alimentación del organofosfato es preferentemente de aproximadamente 1 a 7 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros (véase la Fig. 4), más preferentemente de aproximadamente 1 a 6 mmoles/hora, y aún más preferentemente de aproximadamente 2 a 6 mmoles/hora, incluso aún más preferentemente de aproximadamente 2 a 5 mmoles/hora, y más preferentemente de aproximadamente 3 a 4 mmoles/hora. La velocidad de alimentación óptima depende del proceso, de la densidad celular, de la velocidad de respiración, etc.

35 Además, en una realización preferida, cuando el polipéptido es Apo2L y el organofosfato es glicerol-3-fosfato destinado para modificar la expresión del producto para estar de acuerdo con la fase de crecimiento activo y usando un proceso de 10-L, la velocidad de alimentación del organofosfato es de aproximadamente 4 a 17 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros (véase la Fig. 7), más preferentemente de aproximadamente 6 a 16 mmoles/hora, aún más preferentemente de aproximadamente 8 a 15 mmoles/hora, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 14 mmoles/hora. La velocidad de alimentación óptima del organofosfato requiere determinarse para el proceso individual empleado para la expresión de la proteína heteróloga específica.

45 Cualquier otro ingrediente de los medios necesarios, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico también puede incluirse a concentraciones apropiadas introducido en solitario o como una mezcla con otro ingrediente o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Preferentemente, también está presente un fosfato inorgánico en el medio de cultivo al inicio de la etapa de cultivo. Si dicho fosfato inorgánico, preferentemente fosfato de sodio y/o de potasio, está presente, la proporción de fosfato inorgánico con respecto a organofosfato depende de factores tales como el tipo de polipéptido expresado y el organofosfato empleado. Esta proporción puede ser cualquier proporción, determinada fácilmente por los expertos en la técnica, que varíe típicamente de aproximadamente 1:10 (una parte de Pi por 10 partes de organofosfato) a 1: 0,25. Para el ligando Apo2, preferentemente este varía de aproximadamente 1:4 a 1:0,25, y más preferentemente de aproximadamente 1:3 a 1:0,5, y aún más preferentemente de aproximadamente 1:3 a 1:1, e incluso más preferentemente de aproximadamente 1:2 a 1:1, y más preferentemente de aproximadamente 1:1. Dichas proporciones permiten una introducción temprana de la expresión de la proteína, y en algunos casos, permite que se produzca más producto

55

anteriormente. El pH del medio puede ser cualquier pH de aproximadamente 5-9, dependiendo principalmente del organismo hospedador.

5 Si el promotor es un promotor inducible, para que se produzca la inducción, típicamente las células se cultivan hasta alcanzar una densidad óptica determinada, por ejemplo, una A_{550} de aproximadamente 200 para procesos de alta densidad celular, punto en el cual se inicia la inducción (por ejemplo, por adición de un inductor, por empobrecimiento de un componente del medio, etc.), para inducir la expresión del gen que codifica el polipéptido de interés.

10 Cuando se emplea el promotor de la fosfatasa alcalina, las células de *E. coli* usadas para producir el polipéptido de interés de esta invención se cultivan en medios adecuados en los que el promotor de la fosfatasa alcalina puede inducirse como se describe en líneas generales, por ejemplo, en Sambrook et al., citado anteriormente. En primer lugar, el medio puede contener fosfato inorgánico para el crecimiento de la bacteria en una cantidad suficientemente grande para sostener un crecimiento celular significativo e impedir la inducción de la síntesis de polipéptido heterólogo diana bajo el control del promotor. A medida que crecen las células y utilizan el fosfato, disminuye el nivel de fosfato inorgánico en el medio, causando de esta manera la inducción de la síntesis del polipéptido cuando se agota el fosfato inorgánico. Añadiendo, por ejemplo, una alimentación constituida por una mezcla de G2P y G3P o una alimentación de G3P, el cultivo adicional a una densidad celular mayor, tal como hasta una OD550 de 200 o mayor, se realiza en ausencia de fosfato inorgánico o a niveles de privación de fosfato inorgánico en el periplasma y manteniendo medio de cultivo, dando como resultado un aumento o una extensión de la acumulación del producto.

E. Detección de la Expresión

20 En una muestra, la expresión génica puede medirse directamente, por ejemplo, por transferencia de Northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 77: 5201-5205 (1980)), por transferencia puntual (análisis de ARN) o por hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias que codifican el polipéptido. Pueden emplearse varios marcadores, más habitualmente radioisótopos, particularmente ^{32}P . Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas, tales como nucleótidos modificados usando biotina para la introducción en un polipéptido. Después, la biotina sirve como sitio de unión con avidina o con anticuerpos, que puede marcarse con una gran variedad de marcadores, tales como radionúclidos, compuestos fluorescentes, enzimas o similares. Como alternativa, pueden emplearse ensayos o geles para la detección de proteínas.

30 Para la secreción de un producto génico expresado, la célula hospedadora se cultiva en condiciones suficientes para la secreción del producto génico. Dichas condiciones incluyen, por ejemplo, temperatura, nutrientes y condiciones de densidad celular que permiten la secreción por la célula. Además, dichas condiciones son aquellas en las que la célula puede realizar las funciones celulares básicas de transcripción, traducción y paso de proteínas de un compartimiento celular a otro, como saben los expertos en la técnica.

F. Purificación de Polipéptidos

35 Los siguientes procedimientos, individualmente o en combinación, son ilustrativos de procesos de purificación adecuados, usándose dependientemente uno o más métodos específicos dependientes del tipo de polipéptido: fraccionamiento sobre columnas de inmutofinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía sobre sílice; cromatografía sobre una resina de intercambio iónico tal como S-SEPHAROSE™ y DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; y filtración con gel usando, por ejemplo, medio G-75 SEPHADEX™. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos, tales como, por ejemplo, medio con proteína A-SEPHAROSE™, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

45 La invención se entenderá de un modo más completo por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLO 1 (No de acuerdo con la invención)

Alimentación de G3P a cultivo en matraz agitador para la producción de fragmento de anticuerpo de Llama (cadena pesada) y Apo2L

Antecedentes:

50 La inclusión de G3P 200 mM (concentración final) en un cultivo con bajo contenido en fosfato (CRAP) o alto contenido en fosfato (THCD) se comparó con la adición de control respectiva (agua) para la expresión de una proteína heteróloga en cultivo con matraz agitador. En la primera parte de este Ejemplo, la proteína heteróloga diana

es un monocuerpo de camélido anti-HCG de llama de 13kD. Previamente se ha demostrado que los anticuerpos de camélidos tienen 2 especies, una molécula clásica de IgG que consta de dos cadenas pesadas más dos cadenas ligeras y una molécula de IgG de cadena pesada que carece de una cadena ligera denominada monocuerpo. La cepa BL21 de *E. coli* expresó el monocuerpo de camélido, usando un promotor *tac* en medio con bajo contenido en fosfato (CRAP) o en medio con alto contenido en fosfato (THCD). La secuencia señal de la proteína de unión malE que precede a la secuencia codificante de fragmento de anticuerpo dirige la secreción de la proteína de expresión en el periplasma del hospedador. En la segunda parte de este ejemplo, se usó un promotor T7 para regular la expresión del ligando Apo2 en HMS174, una cepa de *E. coli* K12, en medio complementado con G3P y no complementado con CRAP. En ambos experimentos, la producción de proteína heteróloga se indujo con la adición de IPTG después de alcanzar la densidad celular deseada.

Materiales y Métodos:

Construcción del plásmido pCB36624 86.RIG:

El plásmido PCB36624_86.RIG se construyó modificando el vector pL1602 (Sidhu et al, J. Mol Biol, 296: 487-495 (2000)). El vector pS1602, que tiene la secuencia promotora pTac y la secuencia señal de secreción malE, contenía una secuencia de la hormona del crecimiento humano fusionada con el dominio C-terminal de la proteína de recubrimiento menor del gen 3 (p3) del fago *mu*. La secuencia que codifica la hGH se retiró y la secuencia vector resultante sirvió como la estructura vector para la inserción de un fragmento de ADN sintético que codificaba el anticuerpo anti-HCG de llama (Spinelli et al, Nat Struct Biol 3 (9): 752-757 (1996)). El fagémido resultante (pCB36624) codifica el producto de fusión bajo el control del promotor P_{toc} inducible por IPTG (Amman and Brosius, Gene, 40: 183-190 (1985)). El polipéptido expresado incluyó el péptido señal de la proteína de unión a maltosa, seguido por la región codificante anti-HCG, seguido por una etiqueta epitópica FLAG, seguido por un péptido enlazador rico en Gly/Ser que contenía un codón de terminación supresor, seguido por PC3 (el dominio C-terminal de la proteína de recubrimiento del fago).

Se construyeron bibliotecas de presentación de fagos usando el método de Sidhu et al., J. Mol. Biol., 296: 487-495 (2000) con fagémidos de "terminación molde" diseñados apropiadamente. Como molde para la biblioteca NNS17, se usó un derivado de pCB36624, que contenía codones de terminación TAA en lugar de los codones 93, 94, 100 y 101 para el método de mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al, Methods Enzymol, 154: 367-382 (1987)), con el oligonucleótido mutagénico NNS17 diseñado para restaurar simultáneamente los codones de terminación e introducir 17 codones NNK degenerados entre los codones que codifican Gly95 y Trp103.

NNS17: GCC GTC TAT ACT TGT GGT GCT GGT NNS TGG GGT CAG GGT (SEC ID Nº 3)

Al igual que todos los monocuerpos, el anti-HCG de llama es un miembro de la familia de Vh3 y, como tal, es reconocido por la Proteína A. Como sustituto para la estabilidad mediada por CDR3 se usó la interacción de unión a la Proteína A. Las fagotecas resultantes se clasificaron mediante múltiples rondas contra la proteína A como lectura de estabilidad y expresión estructural. Los sesgos de selección de las bibliotecas clasificadas se analizaron en la distribución de aminoácidos en la biblioteca NNS. La estructura RIG, denominada por la secuencia en las posiciones 96, 97 y 98, volvió a ser el clon más dominante basándose en los restos secuenciados. La secuencia CDR3 de 17 aminoácidos de longitud para la estructura RIG se determinó que era RIGRSVFNLRRESWVTW (SEC ID Nº 4). El fagémido con estructura RIG se renombró pCB36624_86.RIG, con la secuencia de ADN:

5'-GATGTTTCAGT TGCAGGAATC AGGCGGTGGC TTGGTACAGG CCGGAGGTTT GTTGCCTTTG TCCTGTGCTG CCTCGGGTGC TACTGGTTCT ACTTATGATA TGGGCTGGTT TCGTCAGGCT CCGGGTAAAG AACGTGAATC GGTTGCCGCC ATTAAGTGGG GGTCGGCTGG GACTTACTAT GCTTCGTCCG TCCGTGGTCCG TTTTACTATT TCACGGTGATA ATGCCAAAAA AACTGTCTAT TTGCAGATGA ATTCATTGAA ACCAGAAGAT ACTGCCGTCT ATACTTGTGG TGCTGGTAGG ATCGGCCGGT CGGTCTTCAA CTTGAGGAGG GAGAGCTGGG TCACGTGGTG GGGTCAGGGT ACCCAGGTCA CTGTCTCCTC TGCCGGTGGT ATGGATTATA AAGATGATGA TGATAAA-3' (SEC ID Nº: 5)

Construcción del Plásmido pet19b.nohis

Usando técnicas convencionales de biología molecular, se amplificaron los codones 114-281 de Apo2L por reacción en cadena de la polimerasa a partir de un clon de Apo2L de longitud completa aislado de ADN de placenta humana. Para facilitar la clonación, se añadieron nucleótidos adicionales que contenían sitios de restricción en las secuencias 5' y 3', respectivamente. El cebador oligonucleótido 5' tiene la secuencia:

5 'GCTTGCTACATATGGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGA 3' (SEC ID Nº 6)

que contiene el sitio de restricción *Nde* I subrayado. El cebador oligonucleótido 3' tiene la secuencia:

5 'CTTGAATAGGATCCCTATTAGCCAACTAAAAAGGCCCAAAA AACTGGC 3' (SEC ID Nº 7)

que contiene el sitio de restricción *BamH* I subrayado. El fragmento resultante se subclonó usando los sitios de restricción *Nde* I a *BamH* I en un vector de expresión de baculovirus modificado pVL1392 modificado (Pharming) en fase y aguas abajo de una secuencia que contiene una etiqueta de 10His y un sitio de escisión de enteroquinasa (Pitti et al., J. Biol. Chem., 271: 12.687-12.690 (1997)). El vector pVL1392-Apo2L se sometió a digestión con *Nde* I y *BamH* I y el fragmento *Nde* I a *BamH* I generado se subclonó en pET-19b (Novagen), también sometido a digestión con *Nde* I y *BamH* I. El plásmido resultante se denominó pet19b.nohis.

Cepas Bacterianas:

10 Células competentes de BL21 (Stratagene) y HMS174 (Merck) se transformaron con pCB36624_86.RIG y pet19b.nohis, respectivamente, usando procedimientos convencionales. Los transformantes se recogieron después del crecimiento en una placa con LB que contenía carbenicilina 50 µg/ml (LB+ carbenicilina CARB50™), se purificaron en estrías y crecieron en caldo LB con carbenicilina CARB50™ 50 mg/ml en una incubadora a 30 °C. pCB36624_86.RIG confirió resistencia a carbenicilina al hospedador de producción BL21/pCB36624_86.RIG
15 hospedador y pet19b.nohis a HMS174/pet19b.nohis, permitiendo a los hospedadores transformados crecer en presencia del antibiótico.

Medio de Fermentación:

Para la evaluación de la producción del fragmento de anticuerpo de llama y el ligando Apo2 se utilizó medio de cultivo con bajo contenido en fosfato (CRAP) y con alto contenido en fosfato (THCD). La composición de los medios (utilizándose las cantidades de cada componente por litro de medio inicial) se indica a continuación:

Ingrediente	Medio con bajo contenido en PO ₄	Medio con alto contenido en PO ₄
	Cantidad/l	Cantidad/l
Glucosa	5,5 g	5,5 g
Sulfato de Amonio	3,57 g	3,57 g
Na ₂ HPO ₄	-	1,86 g
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	-	0,93 g
Citrato de sodio, Dihidrato	0,71 g	0,71 g
Cloruro de Potasio	1,07 g	1,07 g
Sulfato de Magnesio 1M	7 ml	7 ml
Hicasa SF	5,36 g	-
Extracto de Levadura	5,36 g	5,36 g
Casaminoácidos	-	5,36 g
MOPS 1M, ph 7,3	110ml	110 ml
KOH para ajustar el pH a pH 7,3	según sea necesario	según sea necesario

20 Para preparar 200 mM de medio complementado con G3P, antes de la inoculación, se añadieron 5 ml de DL-alfa-glicerofosfato (G3P) 1 M (Sigma Chem. Co.) a 20 ml de medio con bajo contenido en PO₄ con 50 µg/ml de carbenicilina (medio con bajo contenido en PO₄ + carbenicilina CARB50™) o medio con alto contenido en PO₄ con 50 µg/ml de carbenicilina (medio con alto contenido en PO₄ + carbenicilina CARB50™). Para el medio no complementado (control), se usaron 5 ml de agua en lugar de G3P.

25 Fermentación en Matraz Agitador:

La fermentación en matraz agitador se realizó en un matraz deflector que contenía 25 ml de medio de control o complementado con G3P. Un cultivo de una noche de BL21/pCB36624_86.RIG o HMS174/pet19b.nohis desarrollado en LB+ carbenicilina CARB50™ volvió a diluirse a aproximadamente 1:100 para la inoculación en los medios de control o complementados con G3P. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador a 250 RPM y la
30 expresión del producto se indujo por la adición de 1 mM de IPTG cuando la densidad celular alcanzó aproximadamente el 50-60 % del crecimiento celular potencial mantenido por el medio. Se prepararon sedimentos celulares de 1 ml de caldo de cultivo, extraídos justo antes de la adición del inductor y a aproximadamente 24 horas después de la inoculación y conservaron a -20 °C.

Acumulación de Fragmento de Anticuerpo de Llama Analizado por PAGE y Densitometría:

El sedimento celular congelado (-20 °C) preparado a partir de una muestra de cultivo de 1 ml se descongeló y se resuspendió en suficiente cantidad de TRIS 10 mM, pH 7,6 + EDTA 1 mM, pH 8,0 (TE) para llevar la suspensión celular a una concentración DO 1/25 μ l. Se mezclaron 25 μ l de la suspensión celular TE con 25 μ l de tampón de muestra 2X que contenía beta-mercaptoetanol. La mezcla se calentó a >95 °C durante 5 minutos antes de cargar 10 μ l (equivalente a una DO de 0,2) por pocillo sobre gel Bis-Tris al 10 % (Novex) NU-PAGE™ precolado. La electroforesis se realizó en tampón MES, ácido (2-(N-morfolino) etanosulfónico, en agua desionizada ajustada al pH apropiado, tal como con NaOH 1N). El gel resuelto se tiñó con COOMASSIE BLUE R250™ y después se eliminó la tinción. La intensidad de banda del fragmento de anticuerpo de 13 kD se determinó usando el programa informático de formación de imágenes DIGITAL SCIENCE 1D™ de Kodak después de escanear el gel húmedo con el sistema de formación de imágenes de Kodak.

Acumulación de Ligando Apo2 Analizada por HPLC de Fase Inversa:

El sedimento celular congelado (-20 °C) preparado a partir de una muestra de cultivo de 1 ml se resuspendió en suficiente cantidad de tampón TE para llevar la suspensión celular a una concentración DO1/25 μ l. Se mezclaron 20 μ l de la suspensión celular en 480 μ l de guanidina HCl 6 M, pH 9,0 + ditiotretol (DTT) 100 mM, y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora antes de centrifugarse a 13.000 rpm durante 15 minutos para recuperar el sobrenadante/extracto. El extracto se filtró a través de un filtro giratorio MILLIPORE™ antes de cargar 20 μ l sobre una columna de HPLC (medio POROS® R1/10 de PerSeptive Biosystems) para cromatografía de fase inversa. La separación por HPLC se realizó a 80 °C, fluyendo las fases móviles a 1,0 ml/min y empleando un gradiente de 28 % a 35 % de acetonitrilo con TFA al 0,1 % durante 20 minutos para la resolución del Apo2L lejos de las proteínas contaminantes. El pico de detección fue a una longitud de onda de 280 nm. La cantidad de monómero presente en las muestras se calculó usando un factor de respuesta promedio (mAU/ μ g) derivado del pico bajo el área asociado con 5-20 μ g de patrones purificados analizados mediante el mismo método.

Resultados:

La Figura 1 muestra que el anticuerpo se expresa a niveles más altos tanto en medio con alto contenido en PO₄ (THCD) como en bajo contenido en PO₄ (CRAP) complementado con G3P 200 mM frente al control.

La Figura 2 muestra que la proteína Apo2L se expresa a niveles más altos en medio con bajo contenido en PO₄ (CRAP) complementado con G3P 200 mM frente al control.

EJEMPLO 2 (No de acuerdo con la invención)

Alimentación de G3P al cultivo en Fermentador de 10 l del hospedador de tipo silvestre o (Δ gIpT phoA-ugp+) para la producción de IGF-I regulado por el promotor de la fosfatasa alcalina

Materiales y Métodos:Plásmido pBKIGF-2B para la expresión de IGF-I:

El plásmido pBKIGF-2, usado en el presente documento para la expresión de IGF-I se construyó como se detalla en la Patente de Estados Unidos N° 5.342.763. Este plásmido se construyó a partir de una estructura básica de pBR322. Las secuencias transcripcionales y traduccionales necesarias para la expresión del gen de IGF-I en *E. coli* las proporciona el promotor de la fosfatasa alcalina y las secuencias de Shine-Dalgarno de *trp*. El terminador transcripcional lambda t₀ se situó adyacente al codón de terminación de IGF-I. La secreción de la proteína desde el citoplasma está dirigida por la secuencia señal lamB. La mayoría de rhIGF-I se encuentra en el espacio periplásmico celular. El plásmido pBKIGF-2B confiere resistencia a tetraciclina al hospedador transformado.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento:

Las cepas usadas en la fermentación de IGF-I son derivados de *E. coli* W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219). Se realizaron experimentos concernientes a un hospedador con *gIpT* de tipo silvestre con la cepa 43E7 (*E. coli* W3110 *fhuA(tonA)* Δ (*argF-lac*) *ptr3 degP41* Δ *omp-T* Δ (*nmpc-fepE*) *ilvG* + *phoA*), y experimentos concernientes a un hospedador con una mutación Δ *gIpT* con la cepa 43F6 (*E. coli* W3110 *fhuA(tonA)* Δ (*argF-lac*) *ptr3 degP41* Δ *ompT* Δ (*nmpc-fepE*) *ilvG* + *phoA* Δ *gIpT*). Células competentes de 43E7 o 43F6 se transformaron con pBKIGF-2B usando procedimientos convencionales. Los transformantes se recogieron después del crecimiento en una placa con LB que contenía tetraciclina 20 μ g/ml (LB + tetraciclina TET20™), se purificaron por estrías y se cultivaron en caldo LB con tetraciclina TET20™ 20 μ g/ml en un agitador/incubadora a 37 °C antes de ensayarse en el fermentador. pBKIGF-2B

confiere resistencia a tetraciclina a los hospedadores de producción y permite que el hospedador transformado se desarrolle en presencia del antibiótico.

Procesos de fermentación de 10 l:

5 La composición del medio de fermentación y el protocolo de ejecución usados para la expresión de IGF-I fueron algo similares a los usados en el proceso de IGF-I descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.342.763. Brevemente, se usó un cultivo de siembra en matraz agitador de 43E7/pB-KIGF-2 o 43F6/pBKIGF-2 para inocular el medio de producción enriquecido. La composición del medio (utilizándose las cantidades de cada componente por litro de medio inicial) se describe a continuación:

Ingrediente	Cantidad/l
Glucosa*	200-500 g
Sulfato de Amonio	2-10 g
Fosfato de Sodio, Dihidrato Monobásico	1-5 g
Fosfato de Potasio, Dibásico	1-5 g
Citrato de Sodio, Dihidrato	0,5-5 g
Cloruro de Potasio	0,5-5 g
Sulfato de Magnesio, Heptahidrato	0,5-5 g
Poliol PLURONIC™, L61	0,1-5 ml
Cloruro Férrico, Heptahidrato	10-100 mg
Sulfato de Zinc, Heptahidrato	0,1-10 mg
Cloruro de Cobalto, Hexahidrato	0,1-10 mg
Molibdato de Sodio, Dihidrato	0,1-10 mg
Sulfato de Cobre, Pentahidrato	0,1-10 mg
Ácido Bórico	0,1-10 mg
Sulfato de Manganeso, Monohidrato	0,1-10 mg
Ácido Clorhídrico	10-100 mg
Tetraciclina	4-30 mg
Extracto de Levadura*	5-25 g
NZ Amina AS*	5-25 g
Metionina*	0-5 g
Hidróxido de Amonio	según se requiera para controlar el pH
Ácido Sulfúrico	según se requiera para controlar el pH

*Una parte de la glucosa, extracto de levadura, metionina y NZ Amina AS se añadió al medio inicialmente, suministrándose el resto a través de la fermentación.

10 La fermentación de 10 litros fue un proceso semidiscontinuo con parámetros de fermentación establecidos de la siguiente manera:

Agitación:	1000 RPM
Oxigenación:	10,0 slpm
Control del pH:	7,3
Temp.:	37 °C
15 Contrapresión:	0,03 MPa (0,3 bares)
Alimentación de glucosa:	controlada por ordenador usando un algoritmo para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO ₂) al 30 % de saturación de aire después de disminuir el DO ₂ al 30 %.
20 Alimentación de nitrógeno complejo:	velocidad de alimentación constante de 0,2 ml/min comenzando cuando la DO ₅₀ alcanza 40 y mantenida durante el tiempo de ejecución restante
Duración de la ejecución:	de 40 a 50 horas.

En los experimentos que implican la alimentación con glicerol-3-fosfato (G3P), se incorporó la cantidad apropiada de solución madre de G3P 1 M en la alimentación de nitrógeno complejo y la velocidad de alimentación complementada posterior aumentó para administrar al cultivo la cantidad deseada del nitrógeno complejo más G3P.

5 El impacto de la mutación $\Delta g/pT$ con o sin la alimentación con G3P se evaluó mediante la diferencia en la acumulación de IGF-I. La cantidad total de IGF-I en una muestra disuelta en guanidina 6 M+DTT 100 mM se midió mediante un método de HPLC de fase inversa como se describe en la Patente de Estados Unidos N°. 6.559.122.

Resultados:

10 La Figura 3 muestra que con el hospedador de tipo silvestre (43E7) y el promotor AP y alimentación continua de glucosa, la cantidad de IGF-I segregada era claramente mayor cuando se alimentaba G3P al medio en comparación cuando no se añadía G3P.

15 La Figura 4 muestra que con el hospedador $\Delta g/pT$ (43F6) y el promotor AP, la cantidad de IGF-I secretada era claramente superior cuando se alimentaba con G3P el cultivo a 1,18 o 3,28 mmoles/hora, para aproximadamente 8 litros, en comparación cuando no se añadía G3P, pero no era mayor cuando se alimentaba con G3P a 8,22 mmol/hora, para aproximadamente 8 litros. La velocidad de alimentación óptima la determinará fácilmente un experto en la técnica, en base al producto, tipo de organofosfato, etc. En las condiciones del proceso de fermentación descritas, cultivando en un fermentador de 10 litros para producir IGF-I, hay una velocidad de alimentación óptima de G3P, para aproximadamente 8-10 litros, en el intervalo preferido de aproximadamente 1-7 mmoles/hora, más preferentemente aproximadamente 1-6 mmoles/hora, aún más preferentemente aproximadamente 2-6 mmoles/hora, incluso más preferentemente aproximadamente 2-5 mmoles/hora, y más preferentemente aproximadamente 3-4 mmoles/hora. Este intervalo de velocidad de alimentación no solo aumenta la cantidad de producto sobre el control, sino que también amplía la duración de la producción con respecto al control.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

Alimentación de Glicerol-3-fosfato para mejorar la acumulación del ligando Apo2 en el proceso de 10-l

Antecedentes sobre el ligando Apo2

25 El ligando Apo2 (Apo2L) inductor de apoptosis (Pitti et al., J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996)), también conocido como ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995)), es una proteína de membrana de tipo II y un miembro de la familia de ligandos del TNF. Apo2L/TRAIL desencadena la apoptosis en una gran diversidad de células cancerosas, pero no en la mayoría de las células normales, a través de la unión con sus receptores de muerte afines (WO 99/00423; Ashkenazi, PASEB J., 13: (7) A1336 (23 de abril, 1999); Ashkenazi, Nature Reviews - Cancer, 2: 420-430 (2002)). Un fragmento soluble del dominio extracelular del ligando Apo2, correspondiente a los restos de aminoácidos 114-281 (de ahora en adelante denominado Apo2L/TRAIL), se encuentra actualmente en investigación para posibles estudios clínicos y se ha expresado satisfactoriamente en *E. coli*.

Descripción general del proceso de fermentación:

35 El vector de expresión codifica el uso del promotor de la fosfatasa alcalina (AP) para regular la producción del polipéptido de aproximadamente 19,5 KDa. Los polipéptidos nacientes expresados, después de liberarse de los ribosomas, se pliegan en monómeros en el citoplasma y adicionalmente se asocian para convertirse en el homotrímero biológicamente activo. Durante la fermentación, los parámetros del proceso se establecen de tal manera que las actividades celulares se realizan a velocidades máximas de captación de oxígeno de 40 aproximadamente 3,0 mmoles/l-min. Después de recoger el caldo, la proteína heteróloga atrapada en el citoplasma se libera por alteración celular mecánica en el lisado celular a partir del cual puede recuperarse.

Materiales y Métodos:

Construcción del plásmido pAPApo2-P2RU:

45 El plásmido pAPApo2-P2RU se describe en el documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero de 2001. Brevemente, este plásmido, cuya construcción se muestra en la Figura 5, codifica la co-expresión de Apo-2L (restos de aminoácidos 114-281) y el codón raro de ARNt codificado por *pro2* y *argU*, cuya co-expresión regula el promotor de la fosfatasa alcalina. El plásmido pAPApo2-P2RU, basado en pBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 43: 77-90 (1978)), se usó para producir el Apo-2L en *E. coli*. Las secuencias transcripcionales y traduccionales necesarias para la expresión de Apo-2L la proporciona el promotor de la fosfatasa alcalina y la secuencia *trp* de Shine-Dalgarno, como se describe para el plásmido pHGH1 (Chang et al, Gene, 55: 189-196 (1987)). La secuencia codificante de Apo-2L (de 114-281) se localiza aguas arriba de las secuencias promotoras y de Shine-Dalgarno y 50

está precedida por una metionina iniciadora. La secuencia codificante incluye nucleótidos (mostrados en la Figura 6) que codifican los restos 114-281 de Apo-2L (Figura 6 - SEC ID Nos 1 y 2, respectivamente, para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos) salvo el codón que codifica el resto Pro119 que está cambiado por "CCG" en lugar de por "CCT" para eliminar posibles estructuras secundarias. La secuencia que codifica el terminador transcripcional de lambda (Scholt-Issek et al, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987)) es posterior a la secuencia codificante de Apo-2L.

Adicionalmente, este plásmido también incluye secuencias para la expresión del ARNt codificado por *pro2* (Komine et al, J. Mol Biol, 212: 579-598 (1990)) y *ArgU/dnaY* (García et al, Cell, 45: 453-459 (1986)) de ARNt. Estos genes se clonaron por PCR a partir de *E. coli* W3110 y se colocaron aguas abajo de la secuencia terminadora transcripcional de lambda. Este plásmido confiere resistencia tanto a tetraciclina como a ampicilina al hospedador de producción.

10 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento:

La cepa 43E7 (*E. coli* W3110 *fhuA(tonA) phoA Δ(argF-lac) ptr3 degP ompT ilvG +*) se usó como el hospedador de producción de tipo silvestre para comparar con 43F6, el hospedador *glpT* mutado para la expresión del ligando Apo2 y el codón raro de ARNt. Se prepararon células competentes de 43E7 o 43F6 y se transformaron con pAPApo2-P2RU usando procedimientos convencionales. Los transformantes se recogieron de placas con LB que contenían tetraciclina 20 µg/ml (LB+Tet20), se purificaron en estrías y crecieron en caldo LB con tetraciclina 20 µg/ml en un agitador/incubadora a 30 °C antes de conservarse en DMO a -80 °C.

Proceso de fermentación para la producción de Apo2L:

Se preparó un inóculo en matraz agitador inoculando medio LB estéril que contenía fosfato de sodio 4-6 mM con un vial de cultivo de reserva recién descongelado. Se incluyeron antibióticos apropiados en el medio para proporcionar presión selectiva para garantizar la retención del plásmido. Los cultivos en matraces se incubaron con agitación a aproximadamente 30 °C (28 °C-32 °C) durante 14-18 horas. Este cultivo se usó después para inocular el vaso de fermentación de producción. El volumen de inoculación era entre 0,1 % y 10 % del volumen inicial de medio.

La producción de Apo2L se realizó en el medio de producción proporcionado en la Tabla 1 para conseguir un volumen de cultivo final de aproximadamente 10 litros. El proceso de fermentación se realizó a aproximadamente 30 °C (28-32 °C) y con pH controlado a aproximadamente 7,0 (6,5-7,5). La tasa de oxigenación y la tasa de agitación se establecieron para proporcionar la transferencia de oxígeno adecuada al cultivo. Justo antes de disminuir el fosfato en lotes (a una DO de aproximadamente 75-85), se inició una alimentación con DL-alfa-glicerofosfato (la especificación del producto comercializado muestra una pureza de producto a 80-90 %, indicándose el beta-glicerofosfato como la principal pureza) y se alimentó a la velocidad de alimentación deseada. A lo largo del proceso de fermentación, el cultivo celular se alimentó con glucosa como fuente de carbono primaria basándose en un algoritmo informático garantizando al mismo tiempo condiciones aerobias.

Se realizaron dos adiciones en lote de ZnSO₄ de aproximadamente 50-150 µM (concentración final) durante el proceso de fermentación, una justo antes de la inducción de la expresión del producto, la otra a aproximadamente el punto medio del periodo de producción para el ensamblaje homotrimérico mejorado. En este ejemplo, las adiciones se produjeron a una densidad óptica de cultivo DO₅₅₀ de aproximadamente 80-120 y aproximadamente 28 horas después de la inoculación.

La fermentación se dejó proseguir durante aproximadamente 34-45 horas antes de recogerse.

Tabla 1

<u>Composición del Medio de Producción para el Sistema de Expresión del Promotor AP</u>	
Ingrediente	Cantidad/Litro
Tetraciclina	4-20 mg
Glucosa ^a	10-250 g
Sulfato de amonio ^a	2-8 g
Fosfato de sodio, monobásico, dihidrato ^a	1-5 g
Fosfato de potasio, dibásico ^a	1-5 g
Fosfato de potasio, monobásico ^a	0-5 g
Citrato de sodio, dihidrato ³	0,5-5 g
Cloruro de potasio	0-5 g

Composición del Medio de Producción para el Sistema de Expresión del Promotor AP	
Ingrediente	Cantidad/Litro
Sulfato de magnesio, heptahidrato ³	1,0-10 g
Antiespuma	0-5 ml
Cloruro Férrico, hexahidrato ^a	20-200 mg
Sulfato de zinc, heptahidrato ^a	0,2-20 mg
Cloruro de cobalto, hexahidrato ^a	0,2-20 mg
Molibdato sódico, dihidrato ^a	0,2-20 mg
Sulfato cúprico, pentahidrato ^a	0,2-20 mg
Ácido bórico ^a	0,2-20 mg
Sulfato de manganeso, monohidrato ^a	0,2-20 mg
Hidrolizado de caseína ^a	5-25 g
Extracto de levadura ^a	5-25 g

^a Una parte de estos ingredientes puede alimentar el cultivo durante la fermentación. Se añadió hidróxido de amonio según se necesitase para controlar el pH

Evaluación de la acumulación del producto soluble durante proceso de fermentación por el método de cromatografía HPLC de intercambio iónico:

- 5 Se tomaron muestras de caldo durante la evolución del proceso de fermentación. Se recogieron células de 1 mililitro de muestras de caldo diluido a una densidad celular DO₅₅₀ de 20 por centrifugación y los sedimentos celulares resultantes se conservaron a -20 °C hasta el análisis. Los sedimentos celulares se descongelaron y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de extracción (HEPES 50 mM, pH 8,0, EDTA 50 mM y 0,2 mg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina) y se alteraron mecánicamente para liberar el producto del citoplasma. Los sólidos se retiraron de los lisados celulares por centrifugación antes de cargar los lisados depurados en una columna de HPLC (medio IEX de DIONEX PROPAC™) para la cuantificación de trímeros. El método de ensayo con HPLC resolvió el producto lejos de las proteínas de *E. coli* contaminantes mediante el uso de un gradiente de 5 %-22 % de NaCl 1 M en un tampón fosfato 25 mM (pH 7,5) durante 25 minutos a un caudal de 0,5 ml/min.

Evaluación de la expresión total de Apo2L monomérico durante el proceso de fermentación por cromatografía HPLC de fase inversa:

- 15 Se usó caldo de cultivo reciente o muestras previamente congeladas y después descongeladas para la cuantificación de la producción total de monómero. Se mezclaron 20 µl de la muestra en 480 µl de guanidina HCl 6M, pH 9,0 con DTT 100 mM y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora antes de centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos para recuperar el extracto. El extracto se filtró a través de un filtro giratorio antes de cargar 20 µl sobre una columna de HPLC (medio R1/10 de PerSeptive Biosystems POROS®) para cromatografía de fase inversa. La separación por HPLC se realizó a 80 °C fluyendo las fases móviles a 1,0 ml/min y se empleó un gradiente del 28 % al 35 % de acetonitrilo con TFA al 0,1 % durante 20 minutos para la resolución de Apo2L lejos de las proteínas contaminantes. El pico de detección fue a una longitud de onda de 280 nm. La cantidad de monómero presente en las muestras se calculó usando un factor de respuesta promedio (mUA/mg) derivado del área bajo el pico asociado con 5-20 µg de patrones purificados analizados por el mismo método.

25 Resultados:

- 30 La Figura 7 muestra un título de producto específico mejorado (denominado en el gráfico título específico en µg/DO-ml) con una velocidad de alimentación de G3P óptima para el hospedador ΔglpT (43F6). Todas las ejecuciones alimentadas con G3P se realizaron mejor que con el control sin alimentación. En este ejemplo, a medida que la velocidad de alimentación aumentaba para un cultivo de aproximadamente 8 litros de 6 al 12 mmol/hora, el título específico del producto mejoró, pero a medida que la velocidad aumentaba por encima de 12 mmol/hora a 18 mmol/hora, el título específico disminuía. La velocidad de alimentación óptima de G3P la determina fácilmente un experto en la técnica basándose en el producto, tipo de organofosfato, etc. En estas condiciones particulares, cultivando en un fermentador de 10 litros células para producir este producto específico, Apo2L, la velocidad de

alimentación preferida de G3P, para aproximadamente 8-10 litros, está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 4 a 17 mmol/hora, más preferentemente de aproximadamente 6 a 16 mmol/hora, aún más preferentemente de aproximadamente 8 a 15 mmol/hora, aún más preferentemente de aproximadamente 10 a 14 mmol/hora.

5 La Figura 8 muestra un título específico de producto mejorado (denominado en el gráfico acumulación específica total en $\mu\text{g}/\text{DO-ml}$) alimentando con G3P sobre la alimentación con fosfato inorgánico al hospedador de tipo silvestre *gfpT* (43E7). Aunque la alimentación con glicerofosfato aumentó la acumulación específica total de Apo2L, la alimentación con fosfato inorgánico produjo un impacto negativo específico en la acumulación total en comparación con el control sin alimentación. Podrían esperarse tendencias similares usando una alimentación con menor cantidad de glicerofosfato en comparación con la empleada. Los resultados del presente documento pretenden demostrar, y lo demuestran, que puede obtenerse un nivel de expresión elevado alimentando con glicerofosfato a un hospedador *gfpT* de tipo silvestre. Además, en este experimento particular, similar al caso de la alimentación con fosfato inorgánico, la densidad celular del cultivo aumentó por encima de una DO_{550} de 200 cuando se alimentaba con glicerofosfato, cosa que no se producía en una situación carente de alimentación.

15 EJEMPLO 4

Expresión del producto Apo2L dirigida por el promotor AP durante la fase de crecimiento activo

Se usó la misma construcción de plásmido, producción de cepa hospedadora, composición del medio, proceso de fermentación y métodos de ensayo del producto que los descritos en el Ejemplo 3 excepto para la adición en lotes de fosfato y de G3P. Una parte del fosfato inorgánico típicamente incluida en el lote salino en un proceso de control se sustituyó con un número de moles de G3P equivalente, bien añadidos inmediatamente después de la inoculación o al cabo de algunas horas antes de agotarse el fosfato inorgánico en lotes. En estos ejemplos, el G3P añadido se esperaba que fuese la fuente de fosfato para una fracción significativa del crecimiento celular posterior a la adición.

Proceso de fermentación para la producción de Apo2L durante la fase de crecimiento activo:

El protocolo de preparación del inóculo fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 3. La producción de Apo2L se realizó en el medio de producción proporcionado en la Tabla 1 excepto que cualquiera del 75 % o 50 % de las sales fosfato se eliminaron del lote inicial y se reemplazaron con un número equivalente de moles de G3P añadidos de nuevo como un proceso en lotes posterior a la inoculación. La fermentación se realizó a aproximadamente 30 °C (28-32 °C) y el pH se controló a aproximadamente 7,0 (6,5-7,5) conforme al protocolo convencional. La tasa de oxigenación y la tasa de agitación fueron como se describió en el Ejemplo 3. Para el caso en el que el 50 % del fosfato inorgánico se reemplazaba con G3P, el fosfato inorgánico se procesó en lotes antes de la esterilización del medio mientras que el reemplazo con glicerol-3-fosfato se realizó aproximadamente 1-2 horas antes del fosfato en lotes esperado se agotase (a una DO_{550} de aproximadamente 30-40). Para el caso en el que el 75% del fosfato inorgánico se reemplazaba con G3P, tanto el fosfato inorgánico como el G3P se añadieron inmediatamente después de la inoculación del fermentador. A través del proceso de fermentación, el cultivo celular se alimentó con glucosa como fuente de carbono principal basándose en un algoritmo informatizado garantizando al mismo tiempo las condiciones aerobias. Las adiciones de Zn se realizaron durante el proceso de fermentación como se describe en la sección anterior. La fermentación se dejó proseguir durante aproximadamente 34-45 horas.

Resultados:

La Figura 9 muestra la inducción de la expresión de la proteína heteróloga que se produce significativamente de manera temprana en la fase de crecimiento activo cuando el 50 %-75 % del procesamiento en lotes de PO_4 se reemplazaba con la adición de G3P tanto para los hospedadores de tipo silvestre como para los *gfpT* mutados, desplazando la curva de acumulación total específica a la izquierda de la de los casos de control duplicados realizados con el hospedador de tipo silvestre sin sustitución con G3P. Esto indica una ventaja de esta invención, en la que el producto puede obtenerse de manera temprana durante el proceso de fermentación.

Aunque todas las proporciones de Pi con respecto a G3P ensayadas en el presente documento consiguieron esta ventaja independientemente del tipo de hospedador, la Tabla 2 muestra que usando la proporción 1:1 o 1:3 de Pi con respecto a G3P para el hospedador *gfpT* mutado 43F6 se producía la velocidad de productividad volumétrica de Apo2L más alta (un promedio de aproximadamente 0,34 frente a un promedio aproximadamente 0,24 mg/ml-h para el hospedador control). Además, usando cualquier proporción y el hospedador de tipo silvestre o mutado se obtenía la acumulación máxima específica (en $\mu\text{g}/\text{DO-ml}$) precoz (de 22 a 26 horas frente a de 28 a 30 horas). Esto muestra que, en determinadas realizaciones preferidas, la invención puede obtener cantidades similares, si no superiores, de Apo2L monomérico en un tiempo de fermentación menor de aproximadamente 10 % al 25 % en comparación con cualquier otra manera para mejorar significativamente la productividad del proceso.

Tabla 2

Efecto del Reemplazo de la formación en lotes Inicial de Fosfato Inorgánico con Adición de Glicerofosfato Durante las 30 primeras horas de fermentación

<i>Experimento</i>	Velocidad de Productividad Volumétrica (<i>mg/ml-h</i>)	Tiempo para la Acum. Específica Máxima (<i>μg/DO-ml</i>)	Rendimiento máximo de Apo2L Monomérico Total (<i>g/l</i>)
Control (43E7)	0,27	28	2,9
Control (43E7)	0,21	30	2,8
Pi/G3P @ 1:1 (43F6)	0,34	22,5	3,3
(reemplazo del 50 %)			
Pi/G3P @ 1:1 (43E7)	0,25	22	2,0
(reemplazo del 50 %)			
Pi/G3P @ 1:3 (43F6)	0,34	26,0	3,0
(reemplazo del 75 %)			

EJEMPLO 5 (Ejemplo de referencia)

Expresión del producto Apo2L dirigida por el promotor AP usando una mezcla de alfa y beta glicerofosfato de 50/50

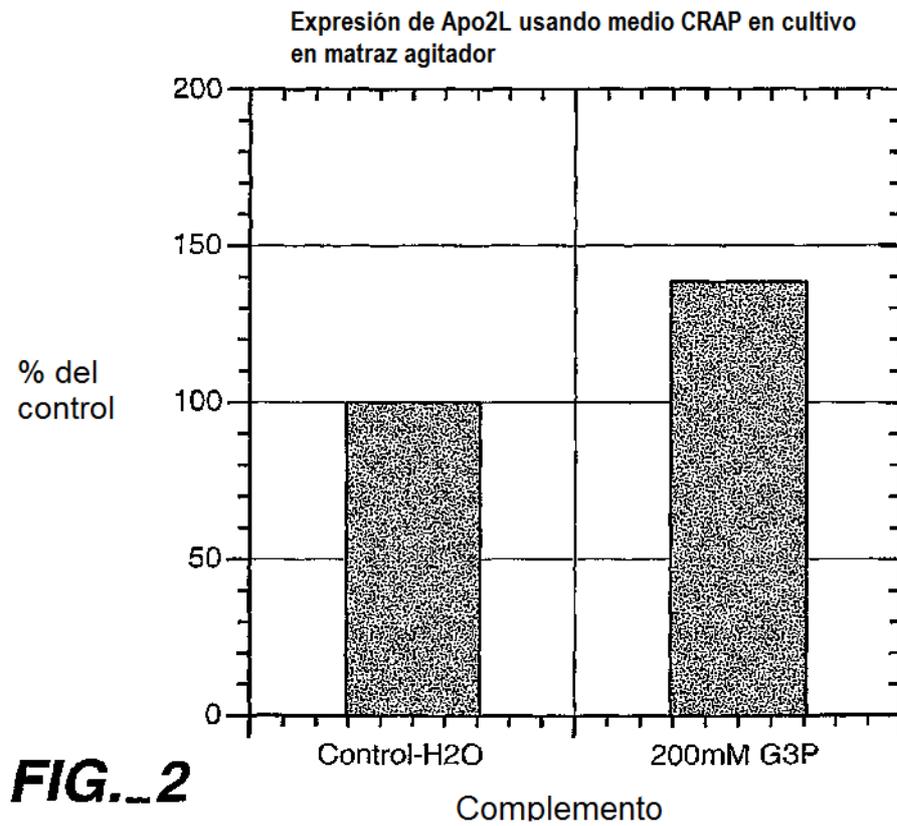
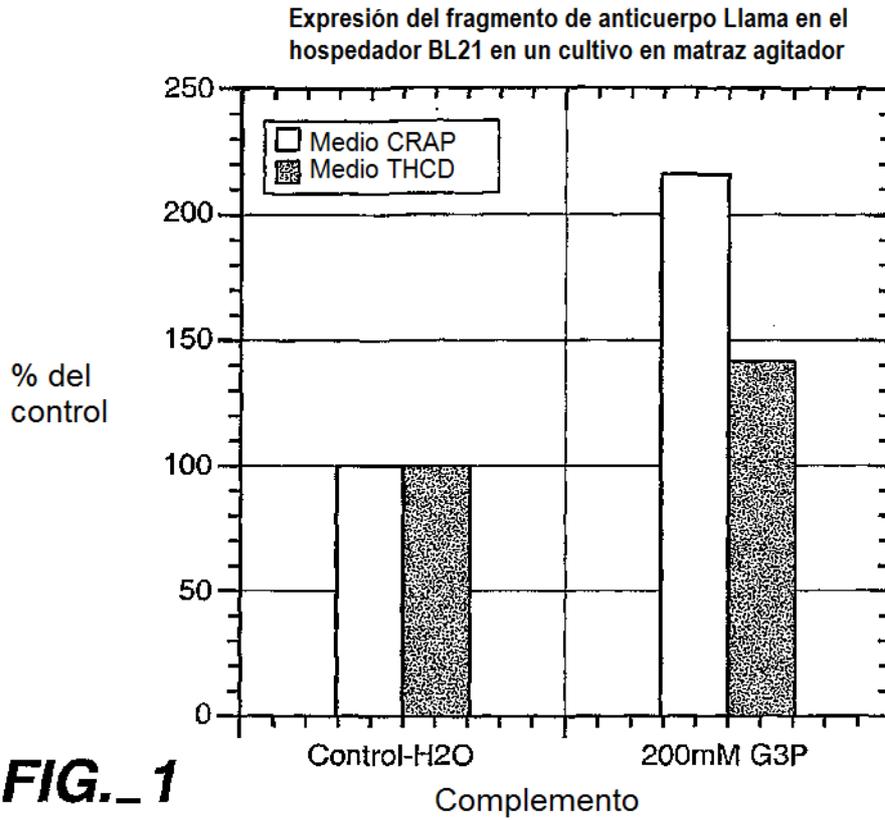
- 5 Se siguió un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 3 excepto que, como alimentación, se empleó un grado más bajo de mezcla de aproximadamente 50:50 de alfa- y beta-glicerofosfato en lugar de G3P usando la cepa 61G1 (hospedador mutante *g/pT*).

Resultados

- 10 La Figura 10 muestra que se obtuvo una mejora de rendimiento similar sobre el control sin alimentación usando la mezcla o el material G3P de grado superior. El uso de la mezcla alfa/beta disminuiría el coste de la materia prima sin comprometer los resultados de producción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la producción y aumento de los rendimientos de un polipéptido heterólogo en *E. coli* que comprende (a) cultivar, en un medio de cultivo, células de *E. coli* que comprenden el ácido nucleico que codifica el polipéptido, alimentando al mismo tiempo el medio de cultivo con un organofosfato transportable que se selecciona del grupo que consiste en alfa-glicerofosfato, beta-glicerofosfato, glicerol-3-fosfato y una mezcla de glicerol-2-fosfato y glicerol-3-fosfato, de tal manera que se exprese el ácido nucleico y (b) recuperar el polipéptido de las células, de tal manera que los rendimientos del polipéptido aumenten, en el que durante la etapa de cultivo se añade fosfato inorgánico al medio de cultivo.
- 10 2. El proceso de uno cualquiera de la reivindicación 1, en el que el cultivo se realiza en un matraz agitador o en un fermentador.
3. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el polipéptido se recupera del citoplasma, periplasma o medio de cultivo de las células.
- 15 4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la expresión del ácido nucleico se regula por un promotor inducible, particularmente en el que el promotor inducible es el promotor de la fosfatasa alcalina, el promotor *tac* o el promotor T7.
5. El proceso de la reivindicación 4, en el que la expresión del ácido nucleico comienza al mismo tiempo en la fase del crecimiento activo de la etapa de cultivo.
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la *E. coli* carece de *phoA* cromosómico.
- 20 7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la *E. coli* es de tipo silvestre con respecto al *glpT* cromosómico.
8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la *E. coli* carece de *glpT* cromosómico.
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, en el que la *E. coli* carece de *phoA* y *glpT* cromosómicos, en particular en el que la *E. coli* no carece de *ugp* cromosómico.
- 25 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polipéptido es un polipéptido eucariota, en particular en el que el polipéptido es un polipéptido de mamífero.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el polipéptido es el factor 1 de crecimiento similar a insulina.
- 30 12. El proceso de la reivindicación 11, en el que la velocidad de alimentación del organofosfato es de aproximadamente 1 a 7 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros y el cultivo se realiza en un fermentador de 10 litros, en particular en el que la velocidad de alimentación del organofosfato es de aproximadamente 2 a 6 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros, más particularmente en el que la velocidad de alimentación del organofosfato es de aproximadamente 3 a 4 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros.
13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el polipéptido es Apo2L.
- 35 14. El proceso de la reivindicación 13 en el que la velocidad de alimentación del organofosfato es de aproximadamente 4 a 17 mmoles/hora para aproximadamente 8-10 litros y el cultivo se realiza en un fermentador de 10 litros, particularmente en el que la velocidad de alimentación es de aproximadamente 6 a 16 mmol/hora para aproximadamente 8-10 litros, más particularmente en el que la velocidad de alimentación es de aproximadamente 8 a 15 mmol/hora para aproximadamente 8-10 litros, incluso más particularmente en el que la velocidad de alimentación es de aproximadamente 10 a 14 mmol/hora para aproximadamente 8-10 litros.
- 40 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la proporción de fosfato inorgánico añadida con respecto al organofosfato varía de aproximadamente 1:10 a 1:0,25, más particularmente en el que el polipéptido es Apo2L y la proporción es de aproximadamente 1:3 a 1:0,5, incluso más particularmente en el que la proporción es de aproximadamente 1:1.



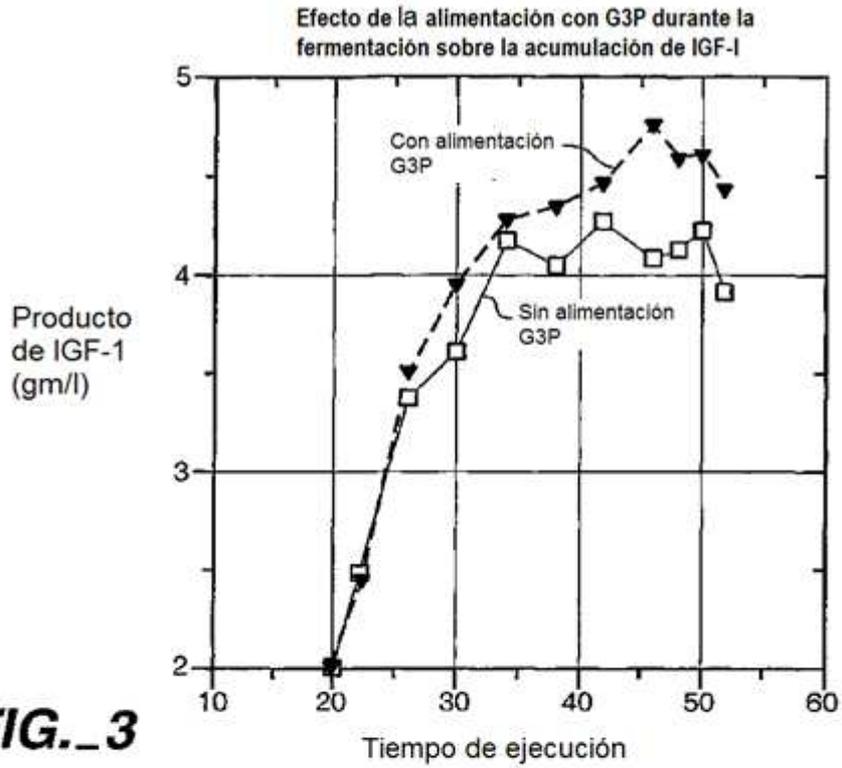


FIG._3

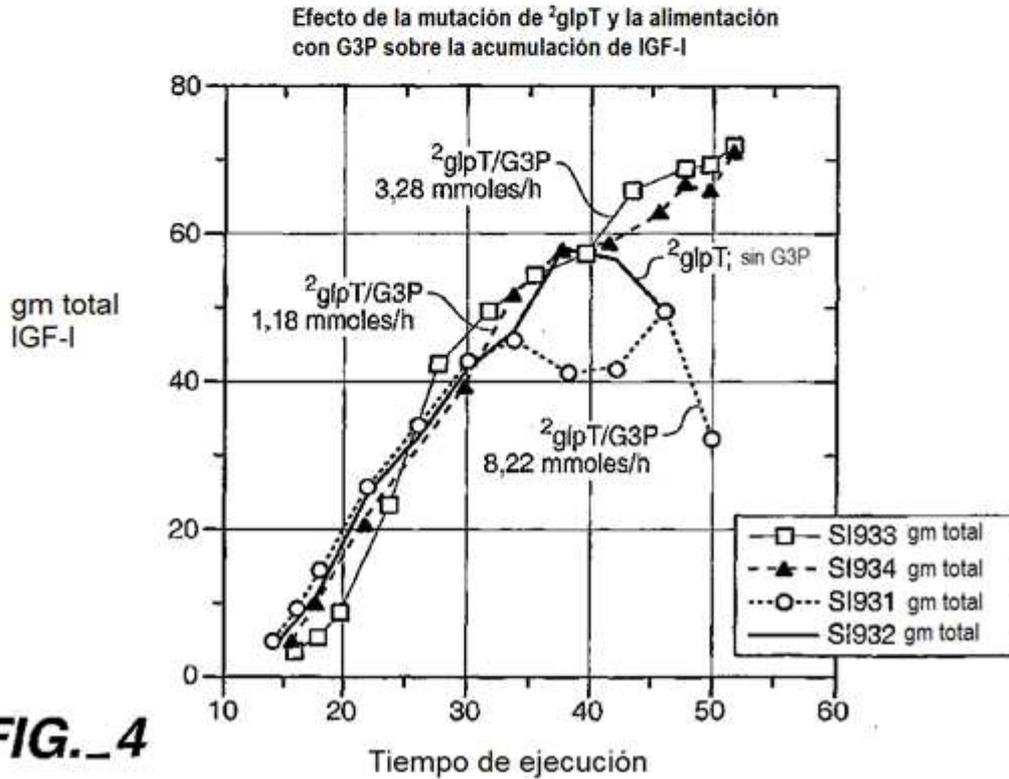


FIG._4

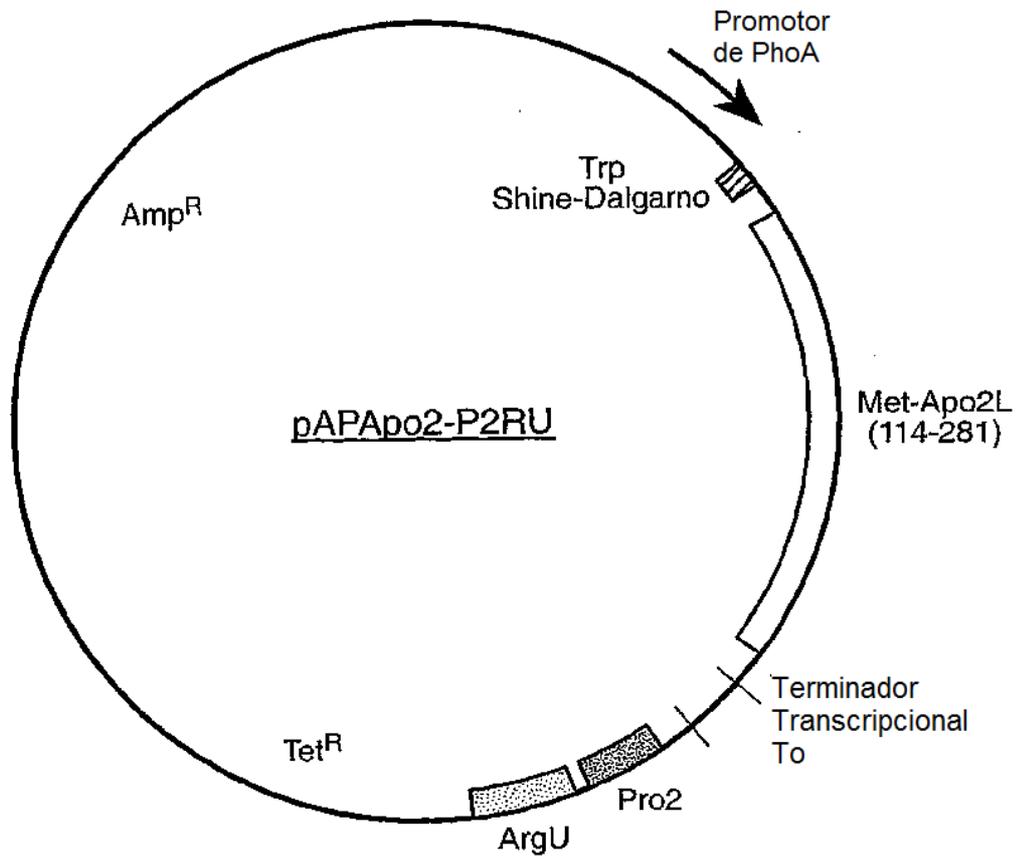
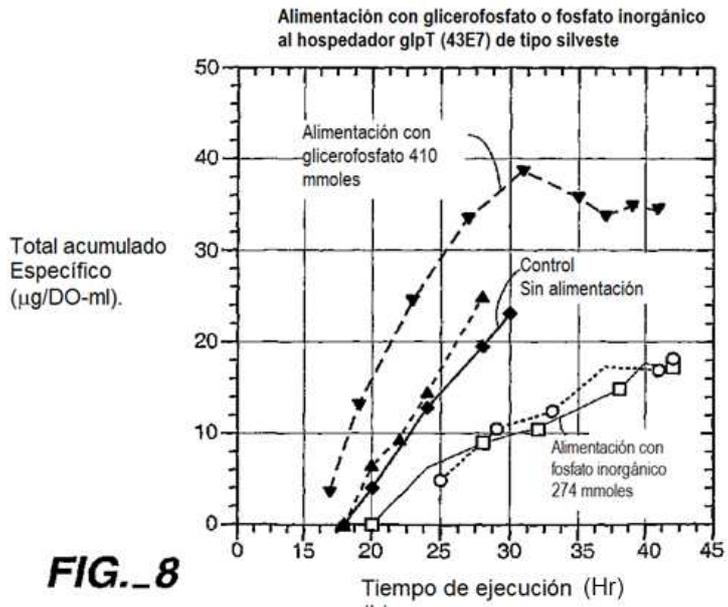
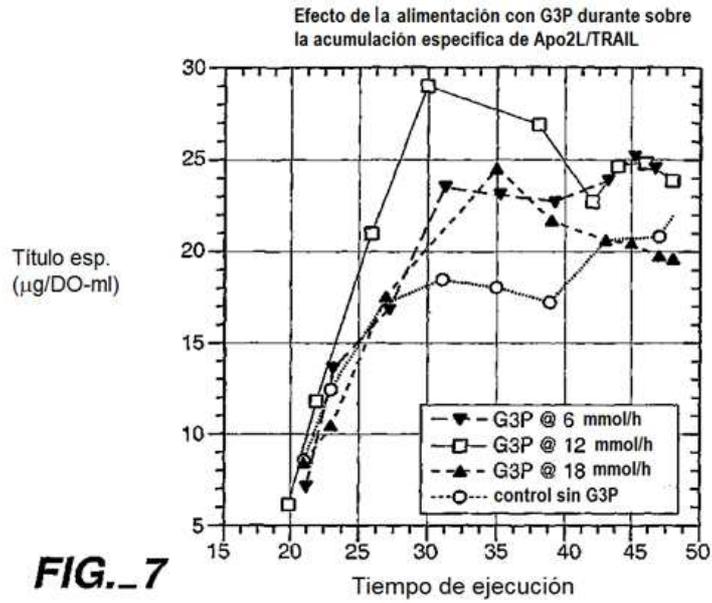


FIG. 5

1 TTTCTCACTGACTATAAAAGAAATAGAGAAGGAAGGGCTTCAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCAGCCTGGGACAGACCTCGTGCTGATCGTGATCTTACACAGTGCCTCCTGCAGTCTCTCTGT
1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
181 GTGGCTGTAACCTACGTGTACTTTACCAACCGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTTCTTAAAGAA
31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGTATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCCGTCAGCTCGTTAGAAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAAAAATAATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGAAGCAACATTTCTCCAAACTCCAAGAAATGAAAAGGCTCTGGGCCCGCAAA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCAATTCATCTCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAATGGTGAACCTCCATGAAAAAGGG
151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGlyLysGly
631 TTTTACTACATCTATCCCAACAFACCTTCGATTTCCAGGAGGAAATAAAAAGAAAACACAAAGAACACAAAATGGTCCCAATATATT
181 PheTryTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTTGATGATAAGTCTAGAAAATAGTTGTTGGTCTAAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
211 TryLysTryThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTATCAAGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAAACAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAAGCCAGTTTTCGGGGCCCTTTTACCTGACCTGGAAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAATCTGACCCAAAACAAAACACAGAAA

FIG.-6



Efecto del reemplazo de fosfato inorgánico en lotes con adición de G3P sobre la acumulación específica de Apo2L/TRAIL durante las primeras 30 h de fermentación

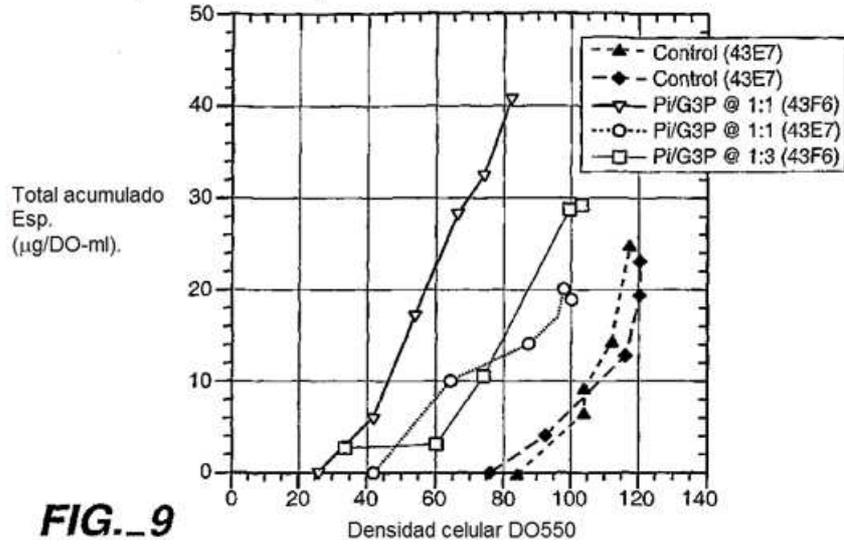


FIG._9

Alimentación de DL-alfa o alfa/beta glicerofosfato al hospedador gIpT de tipo silvestre

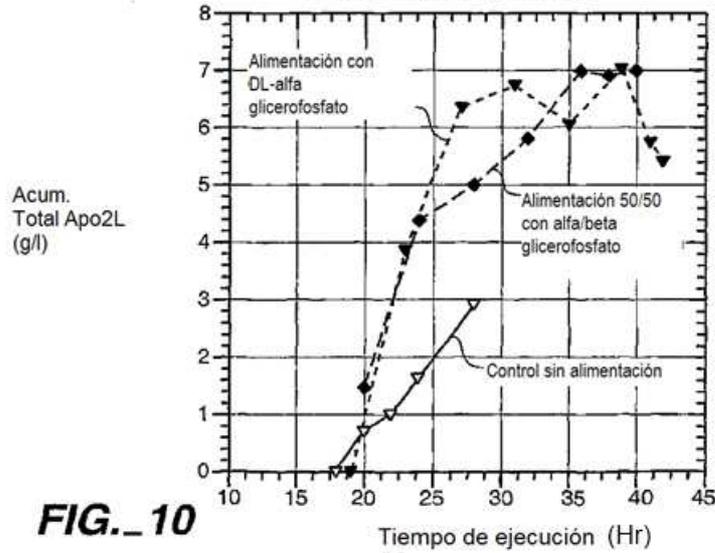


FIG._10