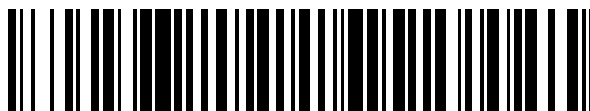


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 290**

51 Int. Cl.:

C12N 1/11 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2003** **E 03007097 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 1350838**

54 Título: **Expresión de proteínas humanas recombinantes en Tetrahymena**

30 Prioridad:

30.03.2002 DE 10214413

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**CILIAN AG (100.0%)
Johann-Krane-Weg 42
48149 Münster, DE**

72 Inventor/es:

**KIY, THOMAS y
RÜSING, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 629 290 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

Expresión de proteínas humanas recombinantes en *Tetrahymena*

- 5 La presente invención se refiere a la expresión recombinante de proteínas humanas en *Tetrahymena*.

La producción de proteínas recombinantes mediante expresión de proteína heteróloga representa una alternativa a la obtención de proteínas a partir de fuentes naturales. Las fuentes naturales de proteínas, por ejemplo como productos farmacéuticos están con frecuencia limitadas, son muy caras en su purificación o simplemente no se encuentran disponibles. Además, debido al riesgo de impurezas tóxicas o en particular infecciosas pueden ser muy problemáticas. La biotecnología y la ingeniería genética permiten por el contrario, hoy en día, una producción económica y segura de una serie completa de proteínas en cantidades suficientes por medio de expresión heteróloga para los más diversos campos de uso: por ejemplo anticuerpos (para el diagnóstico, inmunización pasiva e investigación), hormonas (tales como insulina, eritropoyetina (EPO), interleucinas etc. para el uso terapéutico), enzimas (por ejemplo para el uso en la tecnología de los alimentos, diagnóstico, investigación), factores sanguíneos (para el tratamiento de hemofilia), vacunas, etc. (Glick & Pasternak 1998, Molecular Biotechnology, ASM Press, Washington DC, capítulo 10: 227-252).

Las proteínas humanas para un uso médico deben ser idénticas en sus propiedades bioquímicas, biofísicas y funcionales a la proteína natural. En el caso de una producción recombinante de proteínas de este tipo mediante expresión génica heteróloga ha de observarse a este respecto que, en contraposición a las bacterias en las células eucariotas hay una serie de modificaciones de proteína postraduccionales, por ejemplo la formación de puentes de disulfuro, escisión proteolítica de proteínas precursoras, modificaciones de ésteres de aminoácido, tales como fosforilación, acetilación, acilación, sulfatación, carboxilación, miristilación, palmitilación y en particular glicosilaciones. Además, las proteínas en células eucariotas se llevan con frecuencia a la estructura tridimensional correcta solo mediante un mecanismo complejo con la participación de chaperonas. Estas modificaciones desempeñan un papel muy importante en cuanto a las propiedades estructurales y funcionales específicas de las proteínas, tal como por ejemplo la actividad de enzimas, la especificidad (unión a receptor, reconocimiento celular), plegamiento, solubilidad, etc. de la proteína (Ashford & Platt 1998, en: Post-Translational Processing - A Practical Approach, Ed. Higgins & Hames, Oxford University Press, capítulo 4: 135-174; Glick & Pasternak 1998, Molecular Biotechnology, ASM Press, Washington DC, capítulo 7: 145-169).

Modificaciones que se desvían de la estructura natural pueden llevar por ejemplo a la inactivación de las proteínas o tienen un alto potencial alergénico.

De este modo, por ejemplo la producción de albúmina de suero humano (HSA) en bacterias lleva con frecuencia a proteínas insolubles no plegadas correctamente, dado que faltan las chaperonas necesarias y los puentes de disulfuro no se forman correctamente. Como alternativas para la obtención de HSA natural a partir de sangre de donante humano están en desarrollo por lo tanto distintos sistemas de producción eucariotas para la obtención de HSA recombinante. El espectro llega a este respecto desde la expresión en plantas a través de hongos hasta animales transgénicos o cultivos celulares de mamíferos.

Aunque se ha establecido una serie completa de sistemas de expresión bacterianos y eucariotas para la producción de proteínas recombinantes, no existe ningún sistema universal que cubra el espectro completo de las posibles modificaciones de proteína (en particular en el caso de proteínas eucariotas) y por lo tanto pudiera emplearse de manera universal (Castillo 1995, Bioprocess Technology 21: 13-45; Geise et al. 1996, Prot. Expr. Purif. 8: 271-282; Verma et al. 1998 J. Immunological Methods 216: 165-181; Glick & Pasternak 1998, Molecular Biotechnology, ASM Press, Washington DC, capítulo 7: 145-169). Además es también extraordinariamente problemático que algunos de los sistemas más usados llevan a modificaciones de proteína postraduccionales poco comunes y en parte indeseadas. De este modo las proteínas de levadura expresadas de manera recombinante están en ocasiones de manera extremadamente intensa con restos manosa (véase la figura 1: glicosilación de proteína). Estas denominadas estructuras "high Mannose" (alto contenido de manosa) de levadura se componen a este respecto de aproximadamente 8-50 restos manosa y se diferencian por lo tanto considerablemente de las estructuras de glicoproteína ricas en manosa de células de mamífero, que presentan como máximo 5-9 restos manosa (Moremen et al. 1994, Glycobiology 4(2): 113-125). Estas estructuras de manosa típicas de levadura son alérgenos fuertes y con ello, en el caso de la producción de glicoproteínas recombinantes son muy problemáticas para un uso terapéutico (Tuite et al. 1999, en Protein Expression - A Practical Approach, Ed. Higgins & Hames, Oxford University Press, capítulo 3: en particular página 76). Además, en las levaduras no puede formarse ninguna estructura de glicoproteína híbrida o compleja, lo que limita adicionalmente el uso como sistema de expresión. Las plantas que en los últimos tiempos se discuten y se usan cada vez con mayor frecuencia como sistemas de producción para proteínas recombinantes, presentan por el contrario, en lugar del ácido siálico típico para los mamíferos, xilosa sobre las estructuras de glicoproteína (Ashford & Platt, véase anteriormente). La xilosa y la fucosa alfa-1,3 enlazada detectada en plantas pueden representar un riesgo alérgico y por lo tanto son también problemáticas (Jenkins et al. 1996, Nature Biotech. 14: 975-981).

Por consiguiente, existe precisamente una gran necesidad de nuevos sistemas de expresión eucariotas, sobre todo como alternativas a la producción costosa y muy cara de proteínas recombinantes mediante células de cultivo de mamífero.

5 Un sistema de este tipo cumplirá idealmente los siguientes requisitos:

1) Deben proporcionarse marcadores de selección y elementos de ADN reguladores (tales como señales de transcripción y de traducción, etc.).

10 2) El sistema de expresión debe presentar modificaciones de proteína postraduccionales eucariotas importantes, pero, a este respecto, no provocan ningún alérgeno para los seres humanos.

15 3) La producción de las proteínas recombinantes debe ser lo más sencilla y económica posible, por ejemplo mediante fermentación de las células u organismos a la escala de producción (que puede ascender a varios 1000 L) en medios sencillos y procesamiento sencillo de los productos. Para esto último sería extraordinariamente ventajosa la posibilidad de la secreción de las proteínas expresadas por las células. De este modo es fácilmente posible una separación de las células de los sobrenadantes de cultivo que contienen producto y la cantidad de las impurezas que han de separarse del producto durante el procesamiento, se reduce decisivamente cuando puede prescindirse por completo de una ruptura celular.

20 A los sistemas de expresión eucariotas ya establecidos tales como por ejemplo células de cultivo de levadura, mamífero o de insecto podrían ofrecerse una alternativa interesante protozoos o protistas (como definición véase por ejemplo Henderson's dictionary of biological terms, 10^a ed. 1989, Eleanor Lawrence, Longman Scientific & Technical, England, o Margulis et al. (Eds) 1990. Handbook of Protoctista, Jones & Bartlett, Boston; van den Hoek et al. 1995, Algae - An introduction to phycology, Cambridge University Press) como sistemas de expresión. En el caso de estos organismos se trata de un grupo muy heterogéneo de microorganismos eucariotas, por regla general de 25 camada única. Tienen la compartimentación y diferenciación típica para las células eucariotas. Algunos están relativamente estrechamente relacionados con eucariotas superiores, por otro lado, en cambio, se asemejan en parte en el cultivo y el crecimiento más bien a levaduras o incluso a bacterias y pueden fermentarse de manera relativamente fácil con una alta densidad celular sobre medios simples a gran escala.

30 Para algunos pocos protistas o protozoos se han descritos métodos para la transformación y expresión de proteína heteróloga. En particular en protozoos parasitarios, tales como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* entre otros, se efectuaron distintos ensayos para la transformación y la expresión de proteínas recombinantes (Beverly 2000, WO 00/58483 A2). Kelly (1997, Adv. en Parasitol., Vol 39, 227-270) da una visión general sobre ello. La posibilidad a la expresión de proteína heteróloga se mostró también en una serie de protistas adicionales (microorganismos eucariotas), tal como por ejemplo en el mixomiceto *Dictyostelium discoideum* (Manstein et al. 1995, Gene 162: 129-134, Jung y Williams 1997, Biotechnol. Appl. Biochem. 25: 3-8), en ciliados (documento WO 98/01572 A1) tal como *Paramecium* (Boileau et al. 1999, J. Eukaryot. Microbiol. 46: 56-65) y *Tetrahymena* (Gaertig et al. 1999, Nature Biotech. 17: 462-465, WO 00/46381 A1). También en protistas fotoautótrofos, las microalgas, pudieron expresarse proteínas de manera heteróloga. En este caso se mencionan por ejemplo *Chlamydomonas* (Hall et al. 1993, Gene 124: 75-81), *Volvox* (Schiedmeier et al. 1994, PNAS 91: 5080-5084), dinoflagelados (en Lohuis & Miller 1998, Plant Journal 13: 427-435) y diatomeas (Dunahay et al. 1995, J. Phycol. 31: 1004-1012). En la mayoría de los casos se expresaron a este respecto sin embargo únicamente marcadores de resistencia sencillos o marcadores de selección 45 no humanos. Representa un especial requisito por el contrario la producción de proteínas humanas lo más idénticas posible en células no de mamífero. En particular cuando se trata de proteínas glicosiladas tales como por ejemplo EPO.

50 En el caso de los ciliados *Tetrahymena* se trata de un microorganismo no patógeno, unicelular, eucariota, que está relativamente estrechamente relacionado con eucariotas superiores y que presenta las diferenciaciones celulares típicas para ello. Aunque *Tetrahymena* es un eucariota real, diferenciado de manera compleja, se asemeja en sus propiedades de cultivo y de crecimiento pero más bien a las levaduras o bacterias simples y puede fermentarse adecuadamente sobre medios de leche desnatada relativamente baratos a gran escala. En condiciones óptimas, el tiempo de generación asciende aproximadamente a 1,5-3 h y pueden alcanzarse densidades celulares muy altas (2,2 x 10⁷ células/ml, correspondiente a 48 g/l de biomasa seca) (Kiy y Tiedke 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 576-579; Kiy y Tiedke 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 141-146). Por ello *Tetrahymena* es muy interesante para una producción fermentativa de proteínas recombinantes a gran escala y esencialmente más ventajosa que por 55 ejemplo las células de mamífero.

60 Para obtener la ruptura a través de los patrones de glicosilación de las proteínas producidas por *Tetrahymena*, se examinaron muestras de proteína (en el medio de cultivo de cultivos de *Tetrahymena*) por medio de transferencias de lectina antes o después de la digestión con péptido:NGlicosidasa F (PNGasa F) (métodos según Ashfort & Platt, 1999, véase anteriormente). Además se aislaron los N-glicanos y se secuenciaron con ayuda de la tecnología FACE (empresa Glyko Inc.).

Los ensayos por medio de transferencia de lectina muestran que algunas proteínas de las fracciones microsómicas o de medios están N-glicosilados. En las dos fracciones pudieron detectarse N-glicanos con disacáridos de manosa terminales (enlace sensible a PNGasa F de la lectina GNA). A este respecto se trata de N- glicanos del tipo rico en manosa. Los enlaces de lectina sensibles a PNGasa F no se detectaron de modo que es improbable la presencia de restos fucosa (lectina AAA), de galactosa (RCA, DSA) y de N-acetilglucosamina (DSA, WGA) en los N-glicanos. La fuerte glicosilación hallada de las proteínas de medio no puede atribuirse a la contaminación por el medio usado, dado que los controles correspondientes no mostraron ningún enlace de lectina. Por lo tanto se trata de proteínas secretadas por *Tetrahymena*.

Cuatro de los oligosacáridos N-glicosídicos se aislaron y secuenciaron. A este respecto se trata de las siguientes estructuras: Man5GlcNAc2, Man4GlcNAc2, Man3GlcNAc2 y Man2GlcNAc2. A este respecto se trata de estructuras parciales de las cadenas N-glicosídicas ricas en manosa, tal como se detectaron también por Taniguchi et al. (J. Biol. Chem. 260, 13941-13946 (1985)) para *Tetrahymena pyriformis*. No se encontraron indicaciones sobre cadenas de azúcar N-glicosídicas complejas o híbridas. Con ello se confirmaron los resultados de las transferencias de lectina.

Por lo tanto, *Tetrahymena* muestra glicosilaciones del tipo fundamental sencillo (véase la figura 1). Faltan por completo indicaciones de cadenas oligosídicas en proteínas secretadas. Con respecto a otros sistemas de expresión, *Tetrahymena* tiene por lo tanto una ventaja significativa: Las estructuras de azúcar son esencialmente más similares a las estructuras N-glicosídicas de las células de mamífero que por ejemplo en levaduras (ricas en manosa con muchos más restos manosa y estructura poco común) e insectos y plantas (presencia de xilosa). Para algunas aplicaciones, el tipo de glicosilación simple de *Tetrahymena* podría tener también ventajas frente a los cultivos de células de mamífero, que producen generalmente estructuras de azúcar N-glicosídicas complejas, que con frecuencia influyen considerablemente en la actividad biológica de la proteína (por ejemplo Clearing-rate etc.) y dificultan la producción (véase por ejemplo la producción de eritropoyetina, 80 % de glicosilación errónea). Con ello *Tetrahymena* es muy especialmente adecuada para la expresión de proteínas glicosiladas, tales como por ejemplo eritropoyetina (EPO).

La transformación de *Tetrahymena* puede conseguirse mediante microinyección, electroporación o bombardeo con micropartículas. Para ello se encuentra disponible una serie de vectores, promotores, etc. La selección de los transformantes tiene lugar por medio de un marcador de resistencia. De este modo se transformó *Tetrahymena* por ejemplo de manera satisfactoria con un vector de ADNr (selección mediante una mutación de resistencia a paromicina del ARNr (Tondravi et al. 1986, PNAS 83:4396; Yu et al. 1989, PNAS 86: 8487-8491). En otros experimentos de transformación se expresó satisfactoriamente resistencias de cicloheximida o neomicina en *Tetrahymena* (Yao et al. 1991, PNAS 88:9493-9497; Kahn et al. 1993, PNAS 90: 9295-9299). Además de estos genes marcadores, Gaertig et al. (1999, Nature Biotech. 17: 462-465) han expresado de manera satisfactoria un antígeno parasitario de pescado recombinante (de un ciliado) en *Tetrahymena*. Además Gaertig et al. expresó de manera satisfactoria una ovoalbúmina de gallina parcial en *Tetrahymena* (documento WO 00/46381 A1). La selección tuvo lugar en ambos casos con ayuda de Paclitaxel (taxol). Este sistema desarrollado por Gaertig et al. está pendiente de patente (documento WO 00/46381 A1).

Una integración del gen heterólogo mediante recombinación de ADN homólogo es posible en *Tetrahymena*. De este modo pueden generarse transformantes mitóticamente estables. Mediante la recombinación de ADN homólogo son posibles además también desconexiones génicas dirigidas (*Gene Knockouts*) (Bruns & Cassidy-Hanley en: Methods in Cell Biology, Volumen 62, Ed. Asai & Forney, Academic Press (1999) 501-512); Hai et al. en: Methods in Cell Biology, Volumen 62, Ed. Asai & Forney, Academic Press (1999) 514-531; Gaertig et al. (1999) Nature Biotech. 17: 462-465 o Cassidy- Hanley et al. 1997 Genetics 146:135-147). Además, opcionalmente puede transformarse el macronúcleo somática o el micronúcleo generativo. En el caso de la transformación del macronúcleo se obtienen transformantes estériles, lo que puede ser ventajoso por cuestiones de seguridad o de aceptación.

En vista del estado de la técnica es ahora objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento de producción de realización sencilla y económica para proteínas humanas, que albergue la posibilidad de modificaciones de proteína protraduccionales, que corresponden, lo más posiblemente, al tipo fundamental de las distintas modificaciones de proteína humanas, que permite además preferentemente la secreción de las proteínas recombinantes, preferentemente prescindiendo del uso de señales de secreción no humanas (secuencias de secreción).

Este objetivo se consigue, así como otros objetivos no mencionados explícitamente, que sin embargo pueden derivarse o deducirse sin más de los contextos discutidos inicialmente en el presente documento, mediante las formas de realización definidas en las reivindicaciones de la presente invención.

Proporcionar un procedimiento para la producción de proteínas humanas recombinantes se logra de manera asombrosamente sencilla transformándose células de *Tetrahymena* con ADN recombinante, que contiene al menos un gen funcional que codifica para una proteína humana, cultivándose las células de *Tetrahymena* recombinantes, expresándose el gen que codifica para una proteína humana y aislándose a continuación las proteínas. En particular, las proteínas humanas recombinantes producidas de esta manera presentan patrones de glicosilación

sencillos, cuyas estructuras son esencialmente más semejantes a las de las células de mamífero que por ejemplo a las de las levaduras. Las propiedades de cultivo y de crecimiento corresponden más bien a las de las levaduras, es decir, crecimiento rápido sobre medios baratos, que puede alcanzarse sin un esfuerzo técnico excesivo.

- 5 Una especie preferida de acuerdo con la invención del género *Tetrahymena* es *Tetrahymena thermophila*.

Por una proteína humana se entiende de acuerdo con la invención una proteína para la que puede aislarse una secuencia de ADN correspondiente a partir del ser humano. La secuencia de ADN usada finalmente para la expresión recombinante no tiene que haberse aislado a este respecto a partir de células humanas, esta puede más bien encontrarse también en forma modificada o haberse producido artificialmente. La proteína producida puede presentar también con respecto a la proteína aislable a partir de células humanas mutaciones, tales como delecciones, el intercambio de determinados aminoácidos y más similares. En particular, de acuerdo con la invención con proteínas humanas quiere expresarse proteínas humanas para un uso terapéutico, tales como citocinas (interferonas, interleucinas), enzimas, hormonas (insulina, EPO, hormonas del crecimiento), factores sanguíneos (factor VIII, factor IX) y otros.

Por patrones de glicosilación sencillos se entiende para los fines de la presente invención principalmente patrones de glicosilación de la estructura fundamental GlcNAc2-Man2-5.

20 Por un gen funcional se entiende para los fines de la presente invención un gen que puede expresarse en el organismo objetivo. En particular, un gen funcional comprende por lo tanto, además de una secuencia codificante, un promotor funcional en el organismo objetivo, que lleva a la transcripción de la secuencia codificante. Un promotor funcional de este tipo puede presentar, entre otras, una o varias cajas TATA, cajas CCAAT, cajas GC o secuencias potenciadoras. Además, el gen funcional puede comprender un terminador funcional en el organismo objetivo que lleva a la interrupción de la transcripción y contiene secuencias señal, que llevan a la poliadenilación del ARNm. La secuencia codificante del gen funcional presenta así mismo todas las propiedades necesarias para la traducción en el organismo objetivo (por ejemplo codón de inicio (por ejemplo ATG), codón de parada (TGA), región rica en A antes del inicio (sitio de inicio de la traducción), secuencias Kozak, sitio poli-A. El gen puede presentar también la utilización de codón específica para *Tetrahymena* (Wuitchick & Karrer, J. Eukaryot. Microbiol. (1999)).

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, en el caso del gen expresado se trata de un gen para albúmina de suero humano (HSA) de manera muy especialmente preferente del gen con el número de registro de GenBank: 8392890 o una variante del mismo. Con respecto al tema GenBank véase Benson, D.A. et al., Nuc. Acid Res., 28 (T), 15-18 (2000). La proteína producida es por consiguiente preferentemente albúmina de suero humana.

Por una variante de HSA recombinante se entiende de acuerdo con la invención un gen con al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, de manera especialmente preferente el 90 % y de manera muy especialmente preferente el 95 % de homología con la secuencia del gen con el número de registro de GenBank: 8392890. En particular hibrida una sonda de preferentemente 100 a 300 pb seleccionada de la secuencia del gen con el número de registro de GenBank: 8392890 en las condiciones de hibridación convencionales en una variante de este gen.

45 En el presente trabajo se describe por primera vez la expresión satisfactoria de HSA recombinante en *Tetrahymena* y por lo tanto en realidad por primera vez, que una proteína humana podía expresarse satisfactoriamente en *Tetrahymena*.

Para ello se amplificó por PCR la secuencia codificante completa de HSA inclusive la secuencia líder y se ligó en un vector de expresión de *Tetrahymena* (véase el ejemplo 2). Después de la transformación de *Tetrahymena* con este constructo y la selección de los transformantes en cuanto a la resistencia a taxol (véase el ejemplo 3), se cultivaron cultivos en medios de leche desnatada con la adición de inhibidor de proteasa (véase el ejemplo 5). Las proteínas secretadas por *Tetrahymena* al medio se separaron por medio de SDS-PAGE y se detectó HSA con un anticuerpo específico de HSA en la inmunotransferencia de tipo Western (véase la figura 2). Asombrosamente no se logró solo producir el HSA recombinante, sino también secretarlo al medio.

55 Contra toda expectativa, la secuencia líder humana ha resultado ser totalmente funcional en *Tetrahymena*.

Las células de *Tetrahymena* que secretan la proteína expresada, constituyen una forma de realización preferida de la presente invención. El aislamiento de las proteínas puede tener lugar en esta forma de realización a partir del sobrenadante de cultivo.

60 Una forma de realización muy especialmente preferida de la presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento para la producción de proteínas humanas recombinantes en el que el gen que codifica para la proteína humana comprende una secuencia líder humana que provoca la secreción de la proteína expresada por *Tetrahymena*. Para una descripción de secuencias líder (sinónimo de secuencias señal), o péptidos líder, (o péptidos señal) véase por ejemplo Stryer, L., Biochemie, 4ª edición., Spektrum Akademischer Verlag, 1996, páginas 802-3, o Alberts, B. et al., Molecular Biology of the Cell. 3ª ed. Garland Publishing, Nueva York y Londres, 1994, capítulo 12 o

Lodish, H. et al., Molecular Cell Biology, 4ª ed., W H Freeman & Co. Nueva York, 1999, capítulo 17. De manera muy especialmente preferente, la secuencia líder comprende la secuencia de nucleótidos atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggtta ttcc (SEQ ID No. 5), o codifica para un péptido líder que comprende la secuencia de aminoácidos Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala (SEQ ID No. 6). En otra forma de realización preferida, la secuencia líder comprende una secuencia correspondiente a la secuencia de propéptido aggggtgtgt ttcgtcga (SEQ ID No. 7), o codifica para un propéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Arg Gly Val Phe Arg Arg (SEQ ID No. 8).

En otra forma de realización de la presente invención, se expresa la proteína humana sobre la superficie de las células recombinantes de *Tetrahymena*.

Una divulgación adicional se refiere a células recombinantes de *Tetrahymena*, que contiene ADN que codifica para una proteína humana. Preferentemente, las células recombinantes de *Tetrahymena* expresan el gen humano recombinante. De manera especialmente preferente, el gen expresado comprende una secuencia líder humana. Preferentemente, dicha secuencia líder comprende la SEQ ID No. 5, o codifica para un péptido líder que comprende la SEQ ID No. 6. En otra forma de realización preferida, la secuencia líder comprende una secuencia correspondiente a la secuencia de propéptido SEQ ID No. 7, o codifica para un propéptido que comprende la SEQ ID No. 8.

De manera muy especialmente preferente, las células recombinantes de *Tetrahymena* secretan la proteína humana recombinante. En una forma de realización preferida, en el caso de la proteína expresada y secretada de esta manera se trata de albúmina de suero humano, en particular del producto de expresión del gen con el número de registro de GenBank: 8392890 o una variante del mismo.

Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una glicoproteína humana recombinante, caracterizada por que presenta un patrón de glicosilación típico para *Tetrahymena* con la estructura fundamental GlcNAc2.Man2-5 y que se expresó por una célula de *Tetrahymena*.

Un vector de expresión para la expresión de proteínas humanas en *Tetrahymena*, que comprende una secuencia líder humana, constituye una divulgación adicional.

Por un vector de expresión se entiende de acuerdo con la invención una molécula de ácido nucleico, tal como ADN o ARN, circular o lineal, por ejemplo un plásmido, un cósmido o un cromosoma artificial, que permite introducir un gen recombinante en una célula huésped y expresar el gen en la célula. El vector puede encontrarse de manera episómica en la célula, es decir, puede ser autorreplicante o integrarse en el genoma de la célula huésped. La integración puede tener lugar fortuitamente o también mediante recombinación homóloga. Aparte del gen que va a expresarse recombinante, un vector de expresión de este tipo de acuerdo con la invención puede comprender otras secuencias útiles para el objetivo, tales como sitios de clonación múltiple, secuencias de replicación autónoma, genes marcadores para el huésped como también todas las secuencias necesarias para permitir la replicación en *E. coli* con fines de clonación, tal como un marcador específico de ori, *E. coli*, etc.

En el presente trabajo se describe por primera vez la expresión satisfactoria de una proteína humana en *Tetrahymena*.

Descripción de las figuras:

Figura 1: glicosilación de proteína N-unida

Tipo rico en manosa: con 5-9 restos manosa y 2 restos GlcNAc

Estructura fundamental simple: con 2-5 restos manosa y 2 restos GlcNAc

Tipo complejo: con restos galactosa, fucosa y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)

N-glicanos de levadura se componen exclusivamente del tipo rico en manosa con 8-50 restos manosa.

El tipo vegetalmente complejo no presenta ningún ácido siálico, pero puede tener restos xilosa (potencial alergénico).

Figura 2: expresión de HSA en *Tetrahymena*

Carril 1 y 2: fracción de medio de *Tetrahymena*, transformado con pBHSA tras 24 y tras 48 h, carril K: HSA natural como control. SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie e inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos anti-HSA y anticuerpo secundario (acoplado con fosfatasa alcalina)

Ejemplos:

Los siguientes Ejemplos sirven para explicar la invención sin limitar la invención a estos Ejemplos

Ejemplo 1: Organismos y condiciones de cultivo

Tetrahymena thermophila (cepas B1868 VII, B2086 II, B*VI, CU428, CU427, CU522, proporcionadas por J. Gaertig, University of Georgia, Athens, GA, EE.UU.) se cultivaron en medio SPP modificado (proteoseptona al 2 %, extracto de levadura al 0,1 %, glucosa al 0,2 %, Fe-EDTA al 0,003 % (Gaertig et al. (1994) PNAS 91:4549-4553)) o medio de leche desnatada (leche desnatada en polvo al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, glucosa al 1 %, Fe-EDTA al 0,003 %) o medio MYG (leche desnatada en polvo al 2 %, extracto de levadura al 0,1 %, glucosa al 0,2 %, Fe-EDTA al 0,003 %) con adición de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (medio SPPA)) a 30 °C en 50 ml de volumen en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con agitaciones (150 rpm).

Los plásmidos y fagos se multiplicaron y seleccionaron en *E. coli* XL1-Blue, MRF', TOP10F' o JM109 (Stratagene, Invitrogen, GibcoBRL Life Technologies). El cultivo de las bacterias tuvo lugar en condiciones convencionales en medio LB o NZY, con antibióticos en concentraciones convencionales (Sambrook et al. (1989) MolecularCloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Nueva York).

Ejemplo 2: Producción del constructo de expresión pBHA

El vector pBICH3 (Gaertig et al. 1999 Nature Biotech. 17: 462-465, documento WO 00/46381 A1) contiene la secuencia codificante de la proteína de I-antígeno (G1) de *Ichthyophthirius* flanqueada por las secuencias reguladoras, del gen BTU1 de *Tetrahymena thermophila*. Un plásmido modificado (pBICH3-Nsi) con un sitio de corte Nsi I en el inicio (proporcionado por J. Gaertig, University of Georgia, Athens, GA, EE.UU.) se usó para producir el constructo de expresión pBHA de albúmina de suero humana (HSA, número de registro de GenBank: 8392890). Para ello se introdujeron por medio de PCR los sitios de corte Nsi I y Bam HI en el inicio y la parada de la secuencia de HSA codificante. Para la PCR se empleó un plásmido aislado (ATCC 323324), que contiene las secuencias de ADNc completas de HSA como molde. Los cebadores

HSA-Nsi-1 5' GGCACAATGCATTGGGTAACCTTTATTAGC-3' (SEQ ID No. 1) y

HSA-Bam-R 5'- AAATGGGATCCTCATAAGCCTAAGGCAGCTTGAC-3' (SEQ ID No. 2)

generaron un producto de PCR que contenía la secuencia codificante completa del HSA, flanqueada por los sitios de corte Nsi I y Bam HI. El producto de PCR y el plásmido pBICH3-Nsi se cortaron con las enzimas de restricción Nsi I y Bam HI, se purificaron sobre un gel de agarosa y se ligaron. El constructo de expresión así generado pBHA contenía la secuencia codificante de HSA completa insertada en el marco de lectura correcto en las secuencias reguladoras del gen BTU1. Para la transformación de *Tetrahymena* se linealizó este constructo mediante una digestión con las enzimas de restricción Sac II y Xho I.

En el caso de una transformación satisfactoria, mediante recombinación homóloga se sustituyó el gen BTU1 por este constructo, mediante lo cual se facilitó una resistencia de las células frente a Paclitaxel.

Ejemplo 3: Transformación del macronúcleo de *Tetrahymena* con pBHA

Para una transformación se emplearon 5×10^6 células de *Tetrahymena thermophila* (CU522). El cultivo de las células tuvo lugar en 50 ml de medio SPPA a 30 °C en un matraz Erlenmeyer de 250 ml sobre un agitador a 150 RPM hasta una densidad celular de aproximadamente $3-5 \times 10^5$ células/ml. Las células se sedimentaron mediante centrifugación (1200 g) durante 5 min y el sedimento celular se resuspendió en 50 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se centrifugó tal como anteriormente. Esta etapa de lavado se repitió y las células se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5, más antibióticos) a una densidad celular de 3×10^5 células/ml, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó durante 16-20 h sin agitación a 30 °C (fase de ayuno). Después de la fase de ayuno se determinó de nuevo el número de células, se centrifugó como anteriormente y se ajustaron las células con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) a una concentración de 5×10^6 células/ml. Un ml de la suspensión celular se usó para la transformación. La transformación tuvo lugar por medio de bombardeo con micropartículas (véase a continuación). Para la regeneración se llevaron las células a medio SSPA y se incubaron a 30 °C sin agitación en el matraz Erlenmeyer. Después de 3 h se añadió Paclitaxel® en una concentración final de 20 µM y las células se transfirieron en alícuotas de 100 µl sobre placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células se incubaron en una cada húmeda, oscurecida a 30 °C. Después de 2-3 días pudieron identificarse clones resistentes a Paclitaxel. Los clones positivos se sobreinocularon en medio reciente con Paclitaxel 25 µM. Mediante el cultivo de las células a una concentración creciente de Paclitaxel (hasta 80 µM) se alcanzó una "phenotypic assortment" completa (Gaertig & Kapler (1999)).

Para el análisis de los clones se cultivaron aproximadamente 4 ml de cultivos en SSPA con Paclitaxel, se aisló el ADN (Jacek Gaertig et al. (1994) PNAS 91:4549-4553) y se amplificó por PCR el ADN integrado en el locus de BTU1. Como cebadores sirvieron los cebadores específicos de BTU1 BTU1-5'F (AAAAATAAAAAAGTTTGAAAAAACCTTC SEQ ID No. 3), aproximadamente 50 pb antes del codón de inicio y BTU1-3'R (GTTTAGCTGACCGATTACCTTC (SEQ ID No. 4), 3 pb detrás del codón de parada. Los productos de PCR se analizaron sin cortar y cortados con Hind III, Sac I o Pst I sobre un gel de agarosa al 1 %. La "phenotypic

assortment" completa se examinó a través de RT-PCR con los cebadores específicos de BTU1 (Gaertig & Kapler (1999)).

Ejemplo 4: Transformación biolística (bombardeo con micropartículas)

La transformación de *Tetrahymena thermophila* tuvo lugar por medio de transformación biolística, tal como se describe en Bruns & Cassidy-Hanley (Methods in Cell Biology, Volumen 62 (1999) 501-512); Gaertig et al. (1999) Nature Biotech. 17: 462-465) o Cassidy-Hanley et al. ((1997) Genetics 146:135-147). La manipulación del sistema de suministro de partículas de he Biolistic® PDS-1000 (BIO-RAD) está detallado en el manual correspondiente.

Para la transformación se cargan partículas de oro de 6 mg (0,6 µm; BIO-RAD) con 10 µg de ADN de plásmido linealizado (Sanford et al. (1991) Biotechniques 3:3-16; Bruns & Cassidy-Hanley (1999) Methods in Cell Biology, Volumen 62: 501-512).

Preparación de las partículas de oro: 60 mg de partículas de oro de 0,6 µm (Biorad) se resuspendieron en 1 ml de etanol. Para ello se mezclaron vigorosamente las partículas 3 veces durante, en cada caso, 1-2 min en vórtex. A continuación se centrifugaron las partículas durante 1 min (10000 g) y se extrajo el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta. Las partículas de oro se resuspendieron en 1 ml de agua estéril y se centrifugaron tal como anteriormente. Esta etapa de lavado se repitió una vez, se resuspendió la partícula en 1 ml de glicerol al 50 % y se almacenó en alícuotas en 100 µl a -20 °C.

Preparación de la transformación: Los soportes de macroportadores, macroportadores y pantallas de retención se almacenaron durante varias horas en 100 % de etanol, los discos de ruptura en isopropanol. Un macroportador se colocó a continuación en el soporte de macroportador y se secó al aire.

Carga de las partículas de oro con ADN: Todos los trabajos tuvieron lugar a 4 °C. Partículas de oro, vector preparado, CaCl₂ 2,5 M, Spermidine 1 M, etanol al 70 % y 100 % se enfriaron sobre hielo. Se añadieron 10 µl del ADN de vector linealizado (1 µg/ml) a 100 µl de partículas de oro preparadas y agitaron cuidadosamente con vórtex durante 10 s. A continuación se añadieron primero 100 µl de CaCl₂ 2,5 M, se agitó con vórtex durante 10 s y entonces se añadieron 40 µl de Spermidine 1 M y se agitó con vórtex cuidadosamente durante 10 min. Tras la adición de 200 µl de etanol al 70 % se agitaron con vórtex las partículas durante 1 min y entonces se centrifugaron 1 min a 10000 g. El sedimento se resuspendió en 20 µl de etanol al 100 %, se centrifugó y entonces se resuspendió en 35 µl de etanol al 100 %.

Las partículas así preparadas se añadieron cuidadosamente con una pipeta sobre el centro de un microportador. El microportador se colocó a continuación hasta la transformación en una caja con gel de sílice higroscópico.

Transformación: un ml de las células preparadas (véase anteriormente) se añadió en el centro de un filtro redondo humedecido con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) en una placa Petri y se introdujo en la tira de inserción inferior de la cámara de transformación del sistema de suministro de partículas de He Biolistic® PDS-1000. La transformación tuvo lugar con las partículas de oro preparadas a una presión de 900 psi (dos discos de ruptura de 450 psi) y un vacío de 27 pulgadas de Hg en la cámara de transformación. A continuación se transfirieron las células de inmediato a un matraz Erlenmeyer con 50 ml de medio SPPA y se incubaron a 30 °C sin agitación.

Ejemplo 5: Expresión de HSA en *Tetrahymena*

De transformantes positivos y como controles de células de tipo natural de *Tetrahymena* no transformadas se cultivaron cultivos en matraces Erlenmeyer en 20 ml de medio de leche desnatada con la adición de inhibidor de proteasa (Complete, EDTA-free Protease-Inhibitors-Cocktail Comprimidos, Roche Diagnostics GmbH). Después de 24 h y 48 h (a una densidad celular de aproximadamente 1 x 10⁶ células/ml) se separaron por centrifugación las células y el sobrenadante se mezcló con 1/10 volumen de TCA helado y se incubó 30 min sobre hielo y a continuación se centrifugó durante 30 min a 4 °C a rpm máx. El sedimento se lavó con 300 µl de acetona helada y se centrifugó durante 5 min a 4 °C a rpm máx. El sobrenadante se retiró, se secó el sedimento (vacío), se resuspendió en 150 µl de tampón de muestra y se incubó durante 10 min a 95 °C. Las proteínas así obtenidas de la fracción de medio, de proteínas secretadas por *Tetrahymena* al medio, se separaron por medio de SDS-PAGE según métodos convencionales y se detectó HSA con un anticuerpo específico de HSA (Sigma) en la inmunotransferencia de tipo Western (véase la figura 2). Como control positivo se usó HSA natural (Sigma).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Celanese ventures GmbH

<120> Expresión de proteínas recombinantes en *Tetrahymena*

<130> ax01006de1

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 1
 ggcacaatgc attgggtaac ctttattagc 30

10

<210> 2
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<400> 2
 aaatgggatc ctcataagcc taaggcagct tgac 34

20

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<400> 3
 aaaaataaaa aagtttgaaa aaaaaccttc 30

30

<210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<400> 4
 gtttagctga ccgattcagt tc 22

40

<210> 5
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 5
 atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gtcgagctta ttcc 54

50

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

<400> 6
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

60

Tyr Ser

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

65

<400> 7
 aggggtgtgt ttcgtcga 18

70

<210> 8
 <211> 6

ES 2 629 290 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

5

Arg Gly Val Phe Arg Arg
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes en *Tetrahymena*, que comprende las etapas:
- 10 a) transformación de células de *Tetrahymena* con ADN recombinante, que comprende al menos un gen funcional que codifica para una glicoproteína humana,
b) cultivo de las células recombinantes de *Tetrahymena* y expresión del gen, y
c) aislamiento de las glicoproteínas.
- 15 2. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de *Tetrahymena* secretan la glicoproteína.
3. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de *Tetrahymena* expresan la glicoproteína sobre su superficie.
- 20 4. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el aislamiento de las glicoproteínas tiene lugar a partir del sobrenadante de cultivo.
5. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen que codifica para una glicoproteína humana comprende una secuencia líder humana.
- 25 6. Procedimiento para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la secuencia líder humana lleva a la secreción de la glicoproteína expresada por *Tetrahymena*.
7. Glicoproteína humana recombinante, **caracterizada por que** presenta un patrón de glicosilación con la estructura fundamental GlcNAc2-Man2-5 y se había expresado mediante una célula de *Tetrahymena*.
- 30 8. Uso de una glicoproteína recombinante humana para la producción de un fármaco, **caracterizado por que** la glicoproteína se ha expresado en células de *Tetrahymena* y se ha aislado a partir de las mismas.

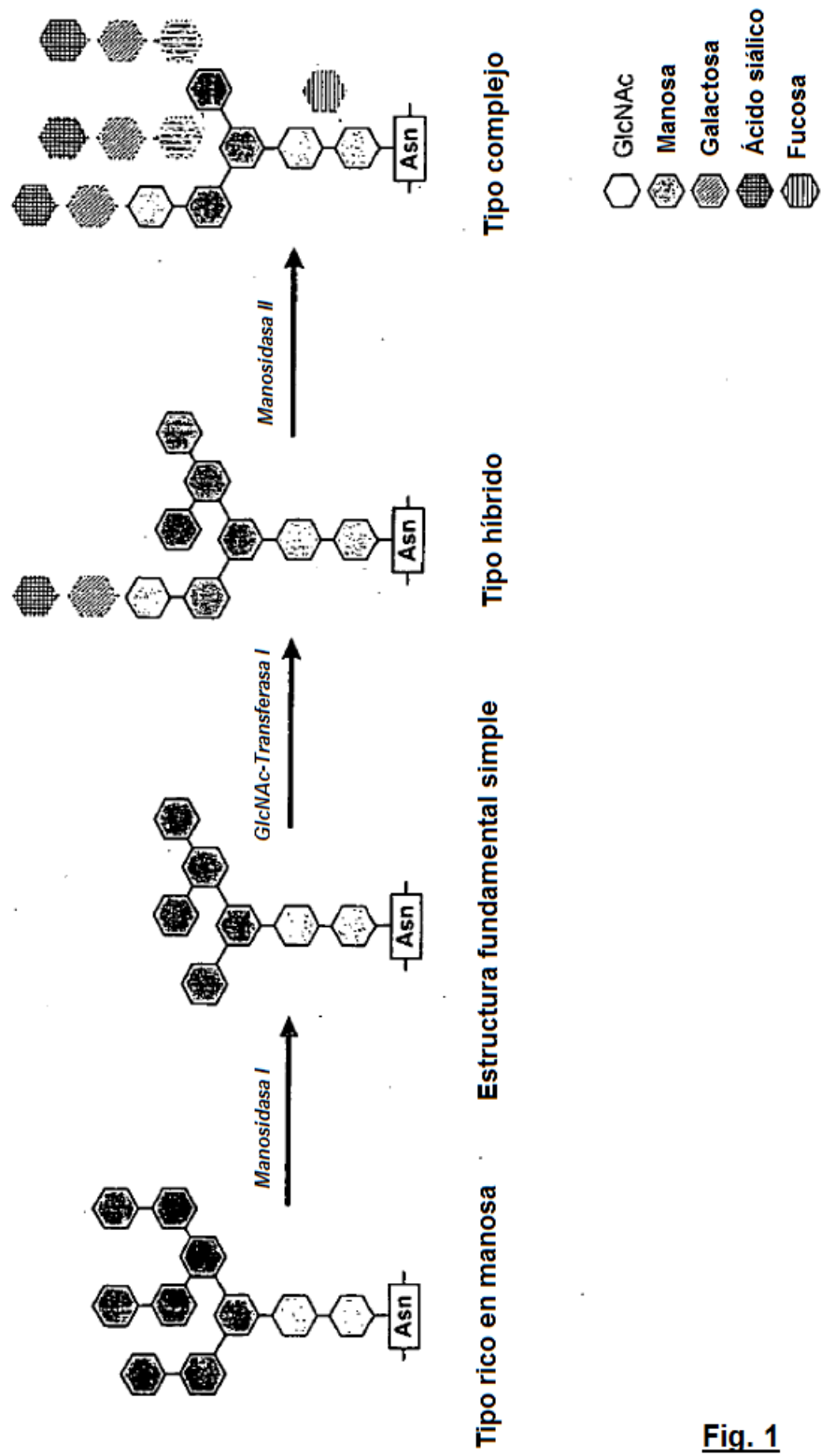


Fig. 1

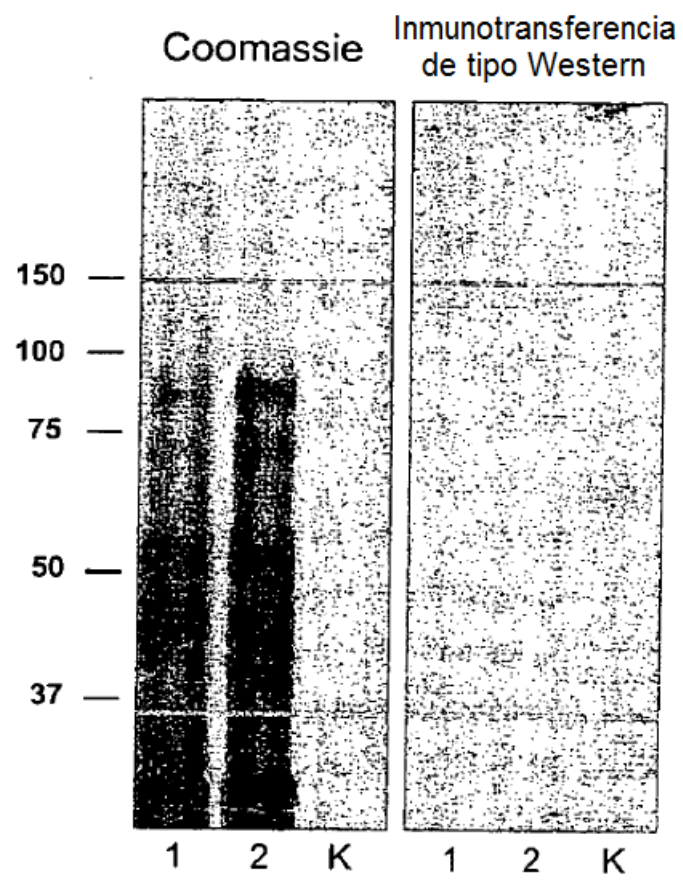


Fig. 2