

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 398**

51 Int. Cl.:

C07K 14/555 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

C12N 15/20 (2006.01)

C12N 15/22 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2011 PCT/US2011/026921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11109556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 11751317 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2542574**

54 Título: **Método para producir proteína de interferón recombinante soluble sin desnaturalización**

30 Prioridad:

04.03.2010 US 310671 P

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**PFENEX INC. (100.0%)
10790 Roselle Street
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**ALLEN, JEFFREY;
FENG, PING-HUA;
PATKAR, ANANT;
HANEY, KEITH, L.;
CHEW, LAWRENCE y
SENGCHANTHALANGSY, LEI LEI PHOKHAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 639 398 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

Método para producir proteína de interferón recombinante soluble sin desnaturalización

Antecedentes de la invención

5 Muchas proteínas recombinantes heterólogas se producen en forma insoluble mal plegada, llamada cuerpos de inclusión, cuando se expresan en sistemas bacterianos. En general, deben usarse reactivos desnaturalizantes para solubilizar la proteína recombinante en los cuerpos de inclusión. La proteína debe renaturalizarse entonces, en condiciones que se hayan optimizado para que la proteína se pliegue apropiadamente. Los esfuerzos invertidos en la optimización, así como el lento proceso de replegamiento y los rendimientos de proceso rebajados añaden costes y tiempo a la producción de una proteína recombinante.

10 Los interferones exhiben actividades antivírica, antiproliferativa, inmunomoduladora y otras. Se han distinguido varios tipos distintos de interferones humanos, incluyendo α , β y γ , basándose p.ej. en sus actividades antivíricas y antiproliferativas. La secreción de interferón se induce por señales, incluyendo virus, ARN bicatenarios, otros polinucleótidos, antígenos y mitógenos. El interferón β es un ejemplo de proteína que se ha expresado en forma recombinante en bacterias, donde se secuestra en cuerpos de inclusión.

15 El interferón β 1b humano es un polipéptido regulador que tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kDa y consiste en 165 residuos aminoácidos. Puede producirse por muchas células del cuerpo, en particular fibroblastos, en respuesta a infección vírica o exposición a otros productos biológicos. Se une a un receptor de superficie celular multimérico. La unión a receptor productiva da como resultado una cascada de eventos intracelulares que conducen a la expresión de genes inducibles de interferón β y desencadenan actividad antivírica, antiproliferativa e inmunomoduladora.

20 El interferón β 1b, específicamente Betaseron (h-IFN- β 1b C17S), se ha usado para tratar enfermedades que incluyen esclerosis múltiple (EM), infecciones por hepatitis B y C, glioma y melanoma. Se ha demostrado que el interferón β reduce el número de ataques sufridos por pacientes con EM recidivante y remitente. Son necesarias cantidades sustanciales de interferón β 1b para uso terapéutico. Se ha producido interferón β 1b recombinante a bajos niveles en células de mamífero, incluyendo fibroblastos humanos y células de CHO. La expresión en células animales está obstaculizada típicamente por dificultades técnicas que incluyen un largo tiempo de proceso, fácil contaminación de los cultivos, el requisito de mantener condiciones de cultivo rigurosas y el alto coste de los medios de cultivo. Como se ha encontrado que el componente de glicoproteína es generalmente innecesario para la actividad del interferón β , la investigación se ha vuelto a la expresión de la proteína recombinante en el sistema de expresión bacteriana de *E. coli*. Como se señala, los cuerpos de inclusión generados en *E. coli* deben solubilizarse por desnaturalización, y replegarse el interferón β . El replegamiento, que es lento, alarga el tiempo de proceso, suma costes y rebaja el rendimiento. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún método para producir rápida y económicamente altos niveles de interferón β recombinante soluble en células hospedadoras de mamífero o bacterianas sin la necesidad de etapas de desnaturalización y replegamiento.

35 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a la expresión de interferón en *P. fluorescens* y al desarrollo de un nuevo método para extraer proteínas activas del producto de fermentación usando detergentes suaves y sin necesidad de un proceso de replegamiento.

40 En particular, la presente invención proporciona un método para producir una proteína interferón de tipo 1 recombinante, comprendiendo dicho método expresar la proteína interferón recombinante cultivando una célula hospedadora de *Pseudomonas* o *E. coli* que contiene un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína interferón de tipo 1 que se ha optimizado para expresión en la célula hospedadora, lisar la célula hospedadora, obtener una fracción insoluble y una fracción soluble de la célula hospedadora lisada, extraer la fracción insoluble sometiénola a condiciones de extracción no desnaturalizantes, en las que dichas condiciones no desnaturalizantes comprenden un detergente iónico dipolar u glucopiranosido de octilo, y una concentración no desnaturalizante de un agente caotrópico, y obtener un sedimento de extracto y un sobrenadante de extracto de la fracción insoluble, en el que la proteína recombinante en el sobrenadante de extracto está presente en forma soluble, forma activa o una combinación de las mismas, sin someterse además a una etapa de renaturalización o replegamiento.

50 En realizaciones específicas, el detergente iónico dipolar es Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-14 o CHAPS. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden Zwittergent 3-14 de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 %. En ciertas realizaciones, el detergente suave no es N-dauroilsarcosina (NLS).

55 En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden además una sal cosmotrópica. En ciertas realizaciones, el agente caotrópico es urea o hidrocloreuro de guanidinio, y la sal cosmotrópica es NaCl, KCl o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En realizaciones específicas, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden

Zwittergent 3-14 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 %; urea de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 M; NaCl de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 M y el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden: 1 % de Zwittergent 3-14; urea 2 M; NaCl 2 M y el pH es de aproximadamente 8,2. En otras realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden adicionalmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % p/v de sólidos. En ciertas realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturalizantes comprenden adicionalmente aproximadamente un 5 % p/v de sólidos.

En realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β , un interferón α , un interferón κ , un interferón τ o un interferón ω . En realizaciones específicas, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β o un interferón α . En realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β y dicho interferón β se selecciona del grupo consistente en: un interferón β 1b humano y un interferón β 1b C17S humano. En realizaciones en las que el interferón de tipo 1 recombinante es un interferón α , el interferón α se selecciona del grupo consistente en: interferón α 2a humano e interferón α 2b humano.

En realizaciones adicionales, el método reivindicado comprende además medir la cantidad de proteína interferón de tipo 1 recombinante en la fracción insoluble y las fracciones de sobrenadante de extracto como se define en las reivindicaciones, en el que la cantidad de proteína interferón recombinante detectada en la fracción de sobrenadante de extracto es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 95 % de la cantidad de proteína interferón recombinante detectada en la fracción insoluble. En otras realizaciones, el método comprende además medir la actividad de la proteína recombinante, en el que se determina que es activa de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 100 % de la proteína recombinante presente en el sobrenadante de extracto. En realizaciones relacionadas, la proteína recombinante es un interferón β y la cantidad de proteína recombinante activa se determina por cromatografía de columna de afinidad Blue Sepharose, ensayo de unión a receptor, ensayo de actividad antivírica o ensayo de efecto citopático. En otras realizaciones, la proteína recombinante es un interferón α , un interferón κ o un interferón ω , y se determina la cantidad de proteína recombinante activa por cromatografía de columna de afinidad Blue Sepharose, ensayo de unión a receptor, ensayo de actividad antivírica o ensayo de efecto citopático.

La invención incluye además métodos para producir una proteína interferón de tipo 1 recombinante como se define en las reivindicaciones, y además en la que se optimizan las condiciones de extracción no desnaturalizantes usando la información de la Figura 4B.

En realizaciones, la proteína recombinante en el sobrenadante de extracto está presente a una concentración de aproximadamente 0,3 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro. En otras realizaciones, la célula hospedadora se cultiva en un volumen de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 o más litros. En realizaciones específicas, la célula hospedadora se cultiva en un volumen de aproximadamente 1 litro, aproximadamente 2 litros, aproximadamente 3 litros, aproximadamente 4 litros, aproximadamente 5 litros, aproximadamente 10 litros, aproximadamente 15 litros o aproximadamente 20 litros.

En realizaciones de la invención, el constructo de expresión comprende un promotor inducible. En realizaciones específicas, el constructo de expresión comprende un derivado del promotor lac y la expresión del interferón se induce por IPTG.

En realizaciones, se hace crecer la célula hospedadora a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C, a un pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5 y se añade IPTG a una concentración final de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM, cuando la DO575 ha alcanzado de aproximadamente 80 a aproximadamente 160. En realizaciones específicas, se hace crecer la célula hospedadora a una temperatura de aproximadamente 32 °C, a un pH de aproximadamente 5,7 a 6,25 y se añade IPTG a una concentración final de aproximadamente 0,2 mM, cuando la DO575 ha alcanzado de aproximadamente 120 a aproximadamente 160.

En realizaciones de la invención, el constructo de expresión comprende un sitio de unión a ribosoma de alta actividad. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una estirpe de delección de proteasa lon hslUV. En otras realizaciones, se expresa el interferón de tipo 1 en el citoplasma de la célula hospedadora. En realizaciones relacionadas, el interferón de tipo 1 es interferón β 1b humano o interferón β 1b C17S humano y se expresa en el citoplasma de la célula hospedadora.

Se proporcionan también métodos para extraer una proteína interferón de tipo 1 recombinante, en los que la proteína interferón recombinante está presente en una fracción insoluble, produciéndose dicha fracción insoluble después de la lisis de una célula hospedadora de *Pseudomonas* o *E. coli* que expresa la proteína interferón recombinante, comprendiendo dicho método someter la fracción insoluble a condiciones de extracción no desnaturalizantes y obtener un sedimento de extracto de la fracción insoluble, comprendiendo dicho sedimento de extracto la proteína interferón recombinante, en los que la proteína interferón recombinante en el sedimento de extracto está en forma soluble, forma activa o una combinación de las mismas, sin someterse a una etapa de renaturalización o plegamiento.

En realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante extraída es un interferón β , un interferón α , un interferón κ , un interferón τ o un interferón ω . En ciertas realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β o un interferón α . En realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β y dicho interferón β se selecciona del grupo consistente en: un interferón β 1b humano y un interferón β 1b C17S humano. En otras realizaciones, el interferón α se selecciona del grupo consistente en: interferón α 2a humano e interferón α 2b humano.

Se proporciona adicionalmente un método para producir una fracción insoluble que comprende una proteína interferón de tipo 1 recombinante, en el que la proteína interferón recombinante se expresa en una célula hospedadora de *Pseudomonas* o *E. coli* a partir de un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que está ligada operativamente con un promotor derivado de lac, comprendiendo dicho método hacer crecer la célula hospedadora a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C y a un pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5, hasta una DO600 de aproximadamente 80 a aproximadamente 160, e inducir la célula hospedadora con IPTG a una concentración de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM, lisar la célula hospedadora y centrifugarla para producir la fracción de sedimento, en el que puede obtenerse la proteína interferón recombinante soluble, activa o soluble y activa extrayendo la fracción de sedimento en condiciones no desnaturizantes sin una etapa de renaturalización o replegamiento posterior.

En realizaciones, la proteína interferón de tipo 1 recombinante comprendida por la fracción insoluble es un interferón β , un interferón α , un interferón κ o un interferón ω . En realizaciones específicas, la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β o un interferón α . En realizaciones en las que la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β , se selecciona el interferón β del grupo consistente en: un interferón β 1b humano y un interferón β 1b C17S humano. En realizaciones en las que la proteína interferón de tipo 1 es un interferón α , se selecciona el interferón α del grupo consistente en: interferón α 2a humano e interferón α 2b humano. En realizaciones, en el método para producir una fracción insoluble que comprende una proteína interferón de tipo 1 recombinante, la temperatura a la que se hace crecer la célula hospedadora es de aproximadamente 32 °C y la concentración de IPTG es de aproximadamente 0,2 mM.

Breve descripción de los dibujos

Se exponen los rasgos novedosos de la invención con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de los rasgos y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas en que se utilizan los principios de la invención y en los dibujos acompañantes.

Figura 1- Evaluación inicial por CGE del IFN- β recuperado de *P. fluorescens* estirpe PS530-001.

A. Proteína analizada en condiciones reductoras. **B.** Proteína analizada en condiciones no reductoras.

Tanto para A como B:

Carril 1. Escala de peso molecular con tamaños como se indican.

Carril 2. Sedimento de la centrifugación inicial después de la lisis celular (fracción insoluble).

Carriles 3-9. Sobrenadante de la centrifugación después de la etapa de extracción. Los carriles 3 a 7 representan la extracción con tampón PBS, con y sin 1 % de Zwittergent 3-14, como se indica, y los carriles 8 y 9 representan la extracción con tampón acetato, sin y con 1 % Zwittergent 3-14, respectivamente.

Carriles 10-13. Sedimento de centrifugación después de la etapa de extracción. Los carriles 10 y 11 representan extracción con tampón PBS, sin y con 1 % de Zwittergent 3-14, respectivamente. Los carriles 12 y 13 representan extracción con tampón acetato, sin y con 1 % de Zwittergent 3-14, respectivamente.

Figura 2. Diagrama de flujo del estudio efectuado para evaluar la extracción de interferón β usando diferentes detergentes.

Figura 3. Diagrama de flujo del estudio diseñado estadísticamente efectuado para evaluar la extracción de interferón β usando diferentes condiciones de extracción que incluyen Zwittergent 3-14.

Figura 4. Resultados del estudio efectuado para evaluar la extracción de interferón β usando diferentes condiciones de extracción que incluyen Zwittergent 3-14.

A. Resumen estadístico. **B.** Intervalos de condiciones de extracción útiles.

Figura 5. Producción de IFN- β insoluble frente al tiempo postinducción para fermentaciones duplicadas.

Se representaron los resultados de tres duplicados diferentes.

Figura 6. Producción de IFN-β insoluble frente al tiempo postinducción para pH y DO alternativos

Se representaron los resultados de tres duplicados diferentes.

Figura 7. Secuencia de IFN-β 1b A. Secuencia aminoacídica de IFN-β 1b C17S. (SEQ ID NO: 1) La secuencia muestra la metionina N-terminal, que no está presente en la proteína purificada. **B.** Secuencia de ADN de IFN-β con codones optimizados para *P. fluorescens*. Esta secuencia codifica la secuencia aminoacídica mostrada en la Figura 7A. (SEQ ID NO: 2) **C.** Secuencia aminoacídica de IFN-β 1b C17S sin metionina N-terminal (SEQ ID NO: 3).

Figura 8. Secuencia de IFN-α 2a. A. Secuencia aminoacídica de IFN-α 2a. (SEQ ID NO: 4) **B.** Secuencia de ADN de IFN-α 2a con codones optimizados para *P. fluorescens*. (SEQ ID NO: 5)

Figura 9. Secuencia de IFN-α 2b. A Secuencia aminoacídica de IFN-α 2b (SEQ ID NO: 6) **B.** Secuencia de ADN de IFN-α 2b con codones optimizados para *P. fluorescens*. (SEQ ID NO: 7)

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir grandes cantidades de proteína interferón recombinante soluble en un sistema de expresión de *Pseudomonas*. En particular, este método elimina la necesidad de la etapa de renaturalización y posterior etapa de renaturalización/replegamiento requerida típicamente.

La producción de interferón β recombinante en sistemas de expresión bacteriana se ha dificultado por el secuestro de la proteína en cuerpos de inclusión insolubles. La solubilización de los cuerpos de inclusión requiere desnaturalización, que a su vez necesita el uso de una etapa de replegamiento que es costosa, consume tiempo y reduce el rendimiento de proteína. La presente invención evita la necesidad de una etapa de replegamiento al proporcionar métodos para producir interferón sin recurrir a la desnaturalización.

Se proporcionan métodos para producir una proteína interferón recombinante que es soluble, activa o ambas cosas en un sistema de expresión bacteriana, sin someter la proteína a una etapa de renaturalización y como se define además en las reivindicaciones. En particular, se describe un proceso de extracción no desnaturalizante que da como resultado la proteína interferón soluble. Los interferones expresados en sistemas de expresión bacterianos están generalmente localizados en la fracción insoluble. En el proceso de extracción de la presente invención, se somete esta fracción insoluble a condiciones de extracción que incluyen concentraciones no desnaturalizantes de detergentes suaves como se definen en las reivindicaciones y se produce proteína soluble.

Se proporcionan también métodos para producir una proteína interferón recombinante en los que se optimizan las condiciones de crecimiento para la célula hospedadora de *Pseudomonas* para maximizar los rendimientos de la proteína interferón recombinante soluble, particularmente cuando se usa el método de extracción de la invención. Se han reseñado estudios del efecto de las condiciones de crecimiento de *E. coli* sobre la producción de proteína soluble. La solubilidad de una proteína dada cuando se expresa en *Pseudomonas* puede ser diferente que en *E. coli*. Esto se ilustra, p.ej., en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2006/0040352, "Expression of Mammalian Proteins in *Pseudomonas Fluorescens*," que muestra comparaciones paralelas de las cantidades solubles de varias proteínas producidas usando *E. coli* o *P. fluorescens* como hospedador. Además, existe una variación sustancial entre las solubilidades de las diferentes proteínas incluso en el mismo hospedador, ya que la solubilidad está fuertemente influida por la estructura proteica, p.ej. la secuencia aminoacídica. Los intentos anteriormente reseñados por producir IFN-β en *E. coli* dieron como resultado proteína que requería replegamiento. Véanse, p.ej., Russell-Harde, 1995, "The Use of Zwittergent 3-14 in the Purification of Recombinant Human Interferon-β Ser17 (Betaseron)" *et al.*, *J. Interferon and Cytokine Res.* 15: 31-37 y Ghane, *et al.*, 2008, "Over Expression of Biologically Active Interferon Beta Using Synthetic Gene in *E. coli*," *J. of Sciences, Islamic Republic of Iran* 19(3): 203-209.

Los métodos proporcionan además condiciones de crecimiento optimizadas incluyendo temperatura de crecimiento, DO en el momento de inducción del promotor, concentración de inductor y pH. Las condiciones de extracción proporcionadas incluyen tipo y concentración de detergente, agente caotrópico, sal cosmotrópica y pH. Se proporcionan valores específicos así como intervalos de parámetros óptimos. Se proporcionan también métodos para optimizar las condiciones de extracción usando los intervalos proporcionados.

Condiciones de crecimiento bacteriano

Se optimizan las condiciones de crecimiento bacteriano para aumentar la cantidad de proteína interferón soluble obtenida usando los métodos de extracción como se proporcionan en la presente memoria. Se contempla también el uso de estas condiciones de crecimiento con otras condiciones de extracción, p.ej. otros métodos descritos y usados en la técnica.

Las condiciones de crecimiento óptimas particularmente útiles junto con los métodos de producción de la invención comprenden: una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C; un pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5 e inducción con IPTG de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM cuando el cultivo ha alcanzado una DO₅₇₅ de aproximadamente 80 a aproximadamente 160.

El pH del cultivo puede mantenerse usando tampones de pH y métodos conocidos por los especialistas en la materia. El control del pH durante el cultivo puede conseguirse también usando amoníaco acuoso. En realizaciones, el pH del cultivo es de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5. En ciertas realizaciones, el pH es 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5. En otras realizaciones, el pH es de 5,7 a 5,9, de 5,8 a 6,0, de 5,9 a 6,1, de 6,0 a 6,2, de 6,1 a 6,3 o de 6,2 a 6,5. En aún otras realizaciones, el pH es de 5,7 a 6,0, de 5,8 a 6,1, de 5,9 a 6,2, de 6,0 a 6,3, de 6,1 a 6,4 o de 6,2 a 6,5. En ciertas realizaciones, el pH es de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,25.

En realizaciones, se mantiene la temperatura de crecimiento de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura de crecimiento es de aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C o aproximadamente 33 °C. En otras realizaciones, se mantiene la temperatura de crecimiento de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 28 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 29 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 31 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 28 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 29 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 31 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 29 °C, de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 31 °C, de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 33 °C, de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 31 °C, de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 31 °C, de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 33 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C, de aproximadamente 31 °C a aproximadamente 32 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C o de aproximadamente 32 °C a aproximadamente 33 °C.

Inducción

Como se describe en otro lugar de la presente memoria, pueden usarse promotores inducibles en el constructo de expresión para controlar la expresión del gen de interferón recombinante. En el caso de derivados o miembros de la familia del promotor lac, p.ej. el promotor tac, el compuesto efector es un inductor tal como un inductor gratuito como IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo, también llamado "tiogalactósido de isopropilo"). En realizaciones, se usa un derivado del promotor lac, y se induce la expresión de interferón mediante la adición de IPTG a una concentración final de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM, cuando la densidad celular ha alcanzado un nivel identificado por una DO_{575} de aproximadamente 80 a aproximadamente 160.

En realizaciones, la DO_{575} en el momento de inducción del cultivo es de aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170 o aproximadamente 180. En otras realizaciones, la DO_{575} es de aproximadamente 80 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 120, de aproximadamente 120 a aproximadamente 140, de aproximadamente 140 a aproximadamente 160. En otras realizaciones, la DO_{575} es de aproximadamente 80 a aproximadamente 120, de aproximadamente 100 a aproximadamente 140 o de aproximadamente 120 a aproximadamente 160. En otras realizaciones, la DO_{575} es de aproximadamente 80 a aproximadamente 140, o de aproximadamente 100 a 160. La densidad celular puede medirse mediante otros métodos y expresarse en otras unidades, p.ej. en células por unidad de volumen. Por ejemplo, una DO_{575} de aproximadamente 80 a aproximadamente 160 de un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* es equivalente a aproximadamente 8×10^{10} a aproximadamente $1,6 \times 10^{11}$ unidades formadoras de colonias por ml o a 35 a 70 g/l de peso celular seco. En realizaciones, la densidad celular en el momento de inducción del cultivo es equivalente a la densidad celular especificada en la presente memoria por la absorbancia a DO_{575} , independientemente del método usado para determinar la densidad celular o las unidades de medida. Un especialista en la materia sabrá cómo realizar la conversión apropiada para cualquier cultivo celular.

En realizaciones, la concentración final de IPTG del cultivo es de aproximadamente 0,08 mM, aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,2 mM, aproximadamente 0,3 mM o aproximadamente 0,4 mM. En otras realizaciones, la concentración final de IPTG del cultivo es de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,1 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,2 mM, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,3 mM, de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 0,4 mM, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,4 mM o de aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,2 mM.

En realizaciones, el interferón se expresa mediante la inducción de un promotor o derivado de lac usando IPTG, lactosa o alolactosa, mediante métodos conocidos en la materia y descritos en la bibliografía, p.ej. en la pat. de EE.UU. n° 7.759.109, "High density growth of T7 expression strains with auto-induction option".

En realizaciones en las que se usa un promotor de tipo no lac, como se describe en la presente memoria y en la bibliografía, pueden usarse otros inductores o efectores.

Después de iniciar la inducción, se hacen crecer los cultivos durante un periodo de tiempo, típicamente de aproximadamente 24 horas, durante cuyo tiempo se expresa la proteína interferón recombinante. Los cultivos celulares pueden concentrarse por centrifugación, y resuspenderse el sedimento de cultivo en un tampón o solución apropiado para el procedimiento de lisis posterior.

- 5 En realizaciones, se rompen las células usando equipos para la rotura celular mecánica a alta presión (que están disponibles comercialmente, p.ej. microfluidizador de Microfluidics, disruptor celular de Constant, homogeneizador de Niro-Soavi u homogeneizador de APV-Gaulin). Puede usarse para liberar la fracción insoluble cualquier método apropiado conocido en la materia por lisar células. Por ejemplo, en realizaciones, pueden usarse reactivos de lisis celular química y/o enzimática tales como enzima lítica de la pared celular y EDTA. El uso de cultivos congelados o
10 anteriormente almacenados está también contemplado en los métodos de la invención. Los cultivos pueden normalizarse por DO antes de la lisis.

- La centrifugación se efectúa usando cualquier equipo y método apropiado. La centrifugación del cultivo o lisado celular con el fin de separar una fracción soluble de una fracción insoluble es bien conocida en la materia. Por ejemplo, las células lisadas pueden centrifugarse a 20.800 x g durante 20 minutos (a 4 °C) y retirarse los sobrenadantes usando manipulación de líquidos manual o automatizada. Se resuspende la fracción de sedimento (insoluble) en una solución tamponada, p.ej. solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4. La resuspensión puede llevarse a cabo, p.ej., usando un equipo tal como impulsores conectados a una mezcladora vertical, barras de agitación magnética, agitadores de balanceo, etc.

- Una "fracción soluble", concretamente el sobrenadante soluble obtenido después de la centrifugación de un lisado, y una "fracción insoluble", concretamente el sedimento obtenido después de la centrifugación de un lisado, son el resultado de la lisis y centrifugación de los cultivos. Puede hacerse referencia también a estas dos fracciones como una "primera fracción soluble" y una "primera fracción insoluble", respectivamente.

- Es posible obtener IFN-β soluble usando métodos de extracción según la invención a partir de cultivos de expresión preparados haciendo crecer cultivos en condiciones en que el pH y la DO de inducción no estén estrechamente controlados (véase, p.ej. el Ejemplo 2). La optimización de las condiciones de crecimiento como se describe en la presente memoria da como resultado una producción sustancialmente aumentada de IFN-β soluble.

Proceso de extracción no desnaturalizante

Se ha descubierto que pueden obtenerse altos niveles de proteína interferón soluble a partir de la fracción insoluble usando condiciones de extracción no desnaturalizantes en métodos de la presente invención.

- 30 Las condiciones de extracción no desnaturalizantes identificadas como particularmente útiles para producir altos niveles de proteína interferón recombinante soluble comprenden: un detergente suave a una concentración no desnaturalizante, p.ej. Zwittergent 3-14 (de 0,5 a 2 % p/v); un agente caotrópico, p.ej. urea (0,5-2 M) y una sal cosmotrópica, p.ej. NaCl (0-2 M), a un pH de tampón de 6,5 a 8,5 y una concentración de sólidos de 5-20 % p/v.

- Después de obtener la fracción soluble y la fracción insoluble, como se describe anteriormente, se extrae la proteína interferón recombinante soluble de la fracción insoluble incubando la fracción insoluble resuspendida en las condiciones de extracción no desnaturalizantes descritas en la presente memoria. Después de la incubación, se centrifuga la mezcla extraída produciendo un "sobrenadante de extracto" (la fracción sobrenadante soluble obtenida después de extracción que contiene proteína recombinante solubilizada) y un "sedimento de extracto" (la fracción de sedimento insoluble obtenida después de extracción). Puede hacerse referencia también a estas fracciones como la
40 "segunda fracción soluble" y la "segunda fracción insoluble".

Condiciones de extracción

- Se evaluaron muchos parámetros diferentes para las condiciones de extracción por su efecto sobre la cantidad de proteína soluble observada en el sobrenadante de extracto, como se describe en el Ejemplo 3 de la presente memoria. Se encontró que se observaba proteína interferón soluble cuando las condiciones de extracción comprendían cualquiera de una serie de diferentes detergentes, a concentraciones variables, así como cuando se variaban otros parámetros. Sin embargo, ciertos parámetros tenían un efecto particularmente notable sobre la cantidad de proteína soluble producida.

- Específicamente, las condiciones de extracción que comprenden detergentes iónicos dipolares (Zwittergent) daban los mejores rendimientos de proteína soluble. En particular, el uso de los detergentes iónicos dipolares Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, Zwittergent 3-12 y especialmente Zwittergent 3-14, daba como resultado los rendimientos mayores. La N-lauroilsarcosina (NLS) daba un rendimiento notablemente alto, sin embargo se encontró que la proteína soluble obtenida era inactiva basándose en un ensayo de afinidad (unión a columna de afinidad Sepharose blue). Por lo tanto, el término "detergentes suaves" como se usa en la presente memoria no pretende incluir N-lauroilsarcosina.

- 55 Se ensayaron los detergentes a concentraciones no desnaturalizantes. Se encontró que una concentración de

Zwittergent 3-14 (propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)) de al menos un 0,5 % (p/v), y preferiblemente 1 %, bien por encima de su concentración micelar crítica (que es de 0,01 %) proporciona la extracción más eficaz de proteína interferón soluble.

5 Por lo tanto, se contempla el uso de concentraciones no desnaturizantes de detergentes suaves, particularmente detergentes iónicos dipolares, más particularmente Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, Zwittergent 3-12 y Zwittergent 3-14, más particularmente Zwittergent 3-14 y no NLS, para uso en las condiciones de extracción de la invención.

10 En otras realizaciones de la invención, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden una concentración de Zwittergent 3-14 de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 % (p/v). En realizaciones, la concentración en p/v de Zwittergent 3-14 es de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 %, de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 2 %, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %. En ciertas realizaciones, la concentración en p/v de Zwittergent 3-14 es de aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 % o aproximadamente 2,0 %.

15 En otras realizaciones de la invención, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden una concentración de Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, o Zwittergent 3-12 de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 % (p/v). En realizaciones, la concentración en p/v de Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10 o Zwittergent 3-12 es de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 %, de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 2 %, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %. En ciertas realizaciones, la concentración en p/v de Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, o Zwittergent 3-12 es de aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 % o aproximadamente 2,0 %.

20 Un detergente suave no causa desplegamiento de proteína a bajos niveles, p.ej. 2 % o menos. Por ejemplo, SDS y NLS se consideran típicamente detergentes más fuertes, ya que pueden desnaturizar proteínas a estos niveles. Una concentración no desnaturizante indica una concentración de un reactivo a la que no se desnaturizan las proteínas. Las proteínas que no se desnaturizan durante el procesamiento no requieren replegamiento.

25 En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturizantes de la presente invención comprenden Zwittergent 3-14 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 %; urea de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 M; NaCl de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 M; y en las que el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

35 La siguiente tabla enumera ejemplos de detergentes comunes, incluyendo detergentes iónicos, no iónicos e iónicos dipolares, y sus propiedades. Es una característica importante de un detergente su concentración micelar crítica (CMC), que se relaciona con su capacidad de solubilización de proteína así como la facilidad de retirada posterior de los detergentes de las soluciones de proteína.

Tabla 1. Ejemplos de detergentes

Detergente	Monómero, PM en Da	Micela, PM en Da	CMC % (p/v)	CMC mM
Zwittergent 3-14	364	30.000	0,004-0,015 (0,011)	0,1-0,4 (0,3)
Tween-20	1228		0,007	0,059
Tween-80	1310	76.000	0,0016	0,012
Triton X-100	650	90.000	0,013-0,06 (0,021)	0,2-0,9 (0,3)
Desoxicolato de sodio	432	4.200	0,21	5
Laurilsarcosina de sodio	293	600	0,4	13,7
NDSB	195	N/A	N/A	N/A
NP-40	617	90.000	0,003-0,018	0,05-0,3
CHAPS	615	6.000	0,37-0,62	6-10

Detergente	Monómero, PM en Da	Micela, PM en Da	CMC % (p/v)	CMC mM
β -Glucopiranosido octilo	292	8.000	0,73	23

Tabla 2. Propiedades físicas de los detergentes iónicos dipolares

Detergente	Monómero, PM en Da	Micela, PM en Da	CMC % (p/v)	CMC mM
Zwittergent 3-08	280	-	9,2	330
Zwittergent 3-10	308	12.500	0,77-1,23	25-40
Zwittergent 3-12	336	18.500	0,067-0,134	2-4
Zwittergent 3-14	364	30.000	0,004-0,015 (0,011)	0,1-0,4 (0,3)
Zwittergent 3-16	392	60.000	0,0004-0,0024	0,01-0,06

- 5 Se observó además que cuando las condiciones de extracción no desnaturizantes comprendían la combinación de un agente caotrópico, urea, una sal cosmotrópica, NaCl, Zwittergent 3-14 y un intervalo de tampón apropiado, el rendimiento de extracción aumentaba varias veces en comparación con el uso de Zwittergent 3-14 solo (véase el Ejemplo 3).

Tabla 3. Intervalos de concentración seleccionados de componentes de extracción

Componente	Intervalo de conc. permisible	Conc. selecc.
Zwittergent 3-14	0,5-2 % (p/v)	1 %
Urea	0-2 M	2 M
NaCl	0-2 M	2 M
Conc. de sólidos	5-20 % (p/v)	5 %
pH de tampón	6,5-8,5	8,2

- 10 El agente caotrópico rompe la estructura tridimensional de una proteína o ácido nucleico, causando la desnaturización. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden concentraciones bajas no desnaturizantes de agentes caotrópicos, p.ej. urea o hidrocloreuro de guanidinio. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden urea a una concentración de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 2 M o mayor. Se observó que la urea 6 M desnaturiza el IFN- β .
 15 Las concentraciones típicamente no desnaturizantes de urea o hidrocloreuro de guanidinio están por debajo de 3 M. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden urea a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M,
 20 aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,9 M o aproximadamente 2,0 M. En otras realizaciones, las condiciones de extracción comprenden hidrocloreuro de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2 M. En realizaciones, las condiciones de extracción comprenden hidrocloreuro de guanidinio a una concentración de 0,5 a 1 M, de 1 a 1,5 M,
 25 de 1,5 a 2 M, de 1 a 2 M, 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,9 M o aproximadamente 2,0 M.

- 30 Las sales cosmotrópicas contribuyen a la estabilidad y estructura de las interacciones agua-agua. Los cosmótopos causan que las moléculas de agua interaccionen favorablemente, lo que estabiliza también las interacciones intermoleculares en macromoléculas tales como proteínas. Puede usarse cualquiera de tales agentes apropiados, como es conocido en la materia, en las condiciones de extracción de la presente invención. En realizaciones, las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden una sal cosmotrópica seleccionada de NaCl, KCl y

(NH₄)₂SO₄. En ciertas realizaciones, está presente NaCl a una concentración de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 2 M. En realizaciones, está presente NaCl en las condiciones de extracción a una concentración de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,75 M, de aproximadamente 0,75 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,25 M, de aproximadamente 1,25 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 1,75 M, de aproximadamente 1,75 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,25 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,85 M, aproximadamente 1,9 M o aproximadamente 2,0 M.

En otras realizaciones, está presente KCl en condiciones de extracción no desnaturalizantes a una concentración de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,75 M, de aproximadamente 0,75 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,25 M, de aproximadamente 1,25 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 1,75 M, de aproximadamente 1,75 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,25 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,85 M, aproximadamente 1,9 M o aproximadamente 2,0 M.

En otras realizaciones, está presente (NH₄)₂SO₄ en las condiciones de extracción no desnaturalizantes a una concentración de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,75 M, de aproximadamente 0,75 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,25 M, de aproximadamente 1,25 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 1,75 M, de aproximadamente 1,75 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,25 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,85 M, aproximadamente 1,9 M o aproximadamente 2,0 M.

Se encontraron las condiciones de extracción más eficaces cuando se mantenía el pH dentro de un intervalo de 6,5 a 8,5. Son tampones de pH útiles aquellos recomendados en los textos de purificación de proteína estándares (p.ej. puede usarse aquí "Protein Purification: Principles and Practice", de Robert Scopes (Springer, 1993), que incluye Tris, Bis-Tris, fosfato, citrato, acetato, glicina, dietanolamina, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, trietanolamina, imidazol, histidina, piridina, etc.). Se han descrito muchos tampones en la bibliografía y están comercialmente disponibles. En realizaciones, el pH de las condiciones de extracción no desnaturalizantes es de aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4 o aproximadamente 8,5. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 6,8, de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 6,9, de aproximadamente 6,7 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,1, de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,2, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,3, de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,4, de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,6, de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,7, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 7,8, de aproximadamente 7,6 a aproximadamente 7,9, de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 8,1, de aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2, de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 8,3, de aproximadamente 8,1 a aproximadamente 8,4 o de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 8,5. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0.

Se varió también la concentración de sólidos en las condiciones de extracción no desnaturalizantes. Este parámetro representa la cantidad de material sólido en la mezcla de incubación de extracción. La concentración de sólidos puede determinarse pesando el sedimento húmedo (concretamente la fracción insoluble) y comparando este peso con el peso total de la mezcla de extracción. Se consiguen concentraciones de sólidos específicas concentrando o

diluyendo la fracción insoluble. Se observaron altos rendimientos de extracción en un intervalo de concentraciones de sólidos de 5 % a 40 % (p/v). En realizaciones de la invención, los sólidos en las condiciones de extracción no desnaturalizantes están presentes a una concentración en p/v de aproximadamente 5 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 12,5 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17,5 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 22,5 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 27,5 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 32,5 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37,5 % o aproximadamente 40 %. En otras realizaciones de la invención, los sólidos en las condiciones de extracción no desnaturalizantes están presentes a una concentración en p/v de aproximadamente 5 % a aproximadamente 7,5 %, de aproximadamente 7,5 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 12,5 %, de aproximadamente 12,5 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 17,5 %, de aproximadamente 17,5 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 22,5 %, de aproximadamente 22,5 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 27,5 %, de aproximadamente 27,5 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 32,5 %, de aproximadamente 32,5 % a aproximadamente 35 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 37,5 %, de aproximadamente 37,5 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 35 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % o de aproximadamente 20 % a aproximadamente 40 %.

En realizaciones, los métodos de producción de la invención se combinan con técnicas de enriquecimiento simultáneas tales como adsorción para potenciar además el rendimiento de proteína.

La proteína solubilizada puede aislarse o purificarse a partir de otra proteína y desechos celulares, por ejemplo, mediante centrifugación y/o cromatografía tal como de exclusión por tamaño, intercambio aniónico o catiónico, interacción hidrófoba o cromatografía de afinidad.

Interferones

Los interferones humanos se han clasificado en tres tipos principales: interferón de tipo I: los IFN de tipo I se unen a un complejo receptor de superficie celular específico conocido como el receptor de IFN- α (IFNAR) que consiste en las cadenas IFNAR1 e IFNAR2. Los interferones de tipo 1 humanos incluyen IFN- α , IFN- β , IFN- κ e IFN- ω e IFN- ϵ . Tipo de interferón II: los IFN de tipo II (IFN- γ) humanos se unen a IFNGR. Interferón de tipo III: los interferones de tipo III señalizan a través de un complejo receptor consistente en IL10R2 (también llamado CRF2-4) e IFNLR1 (también llamado CRF2-12).

El interferón de tipo I humano parece unirse a subunidades de dos receptores, IFNAR-1 y 2, que están ampliamente distribuidas sobre la superficie celular de diversos tipos celulares. La implicación del ligando conduce a la inducción de la fosforilación de las tirosina cinasas TYK2 y JAK-1, que están acopladas con IFNAR-1 y 2 respectivamente. Una vez fosforiladas, se liberan las proteínas STAT del receptor y forman homodímeros así como heterodímeros. Una vez liberados, los dímeros de STAT se asocian con el factor sensible a interferón 9 (IRF-9), una proteína de unión a ADN, formando un complejo llamado factor 3 de gen estimulado por IFN (ISGF-3), que migra al núcleo. A continuación, se une el complejo ISGF-3 a un elemento de ADN existente en dirección aguas arriba de todos los genes inducibles por IFN. Los interferones de tipo 1 se describen extensamente en la bibliografía, p.ej. en la pat. de EE.UU. n.º. 7.625.555, "Recombinant human interferon-like proteins".

Los IFN de tipo 1 tienen una similitud estructural sustancial, como se evidencia por sus secuencias y su capacidad de unión a receptor compartida. Según Kontsek, P., 1994, "Human type I interferons: structure and function," *Acta Virol.* 38(6): 345-60, los interferones de tipo 1 humanos (se habían reseñado 13 hasta la fecha) tienen un 20 % de homología de secuencia global, que determina un plegamiento secundario y terciario idéntico de los polipéptidos. Además, Kontsek reseña que los modelos tridimensionales sugieren que la estructura globular de IFN de tipo I consiste en un haz de 5 hélices α que podrían formar dos dominios polipeptídicos. El enlace disulfuro Cys 29-Cys 139 estabiliza ambos dominios en una configuración bioactiva. Se cree que dos regiones hidrófilas conservadas asociadas con los aminoácidos (aa) 30-41 y 120-145 constituyen el marco básico del sitio de reconocimiento de receptor en IFN de tipo I, y se especula que los diferentes espectros de efectos biológicos entre los IFN de tipo I humano son debidos a una heterogeneidad secuencial sutil en los segmentos de aa 30-41 y 120-145 y las regiones hidrófilas variables de aa 23-26, 68-85 y 112-121. Una reseña posterior de Oritani, *et al.*, 2001, "Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions," *Cytokine Growth Factor Rev* 12(4): 337-48, describe miembros de la familia IFN- α , IFN- β , IFN- π e IFN- τ . El artículo reseña también que IFN- α e IFN- β tienen una estructura globular compuesta por cinco hélices α , y discute análisis de secuencia comparativa, una estructura tridimensional prototípica, el análisis con anticuerpos monoclonales y la construcción de moléculas híbridas y mutagénesis dirigida a sitio.

Se contempla la producción de cualquier proteína interferón de tipo 1 usando los métodos de la presente invención.

Las proteínas interferón de tipo 1 que pueden producirse usando los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, IFN- α 2a y 2b humano, IFN- β 1b humano, IFN- κ humano (p.ej., NM_020124, AAK63835, y descrito por LaFleur, *et al.*, 2001, "Interferon kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes," J. Biol. Chem. 276 (43), 39765-39771) e IFN- ω humano (p.ej., NM_002177, NP_002168 y descritos en la pat. de EE.UU. n° 7.470.675, "Methods for treating cancer using interferon-or-expressing polynucleotides"). Se contempla también la producción de IFN- τ usando los métodos de la invención. Las secuencias aminoacídica y de ácido nucleico están públicamente disponibles, p.ej., en GenBank.

Se han descrito catorce subtipos de proteínas IFN- α : IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 e IFNA21. El IFN- α se realiza sintéticamente como agente terapéutico, como interferón alfa-2a pegilado y como interferón alfa-2b pegilado.

El IFN- β (IFNB1 o IFN- β 1b) es el subtipo β principal (véase, p.ej., GenBank NP002167.1, que proporciona la secuencia del péptido maduro). Betaseron es un análogo de IFN- β humano en que la serina se genomanipuló para sustituir a la cisteína en posición 17, conocido como IFN- β 1b C17S (descrito en la pat. de EE.UU. n° 4.588.585, "Human recombinant cysteine depleted interferon- β muteins"). La molécula es un polipéptido pequeño de 165 aminoácidos con un solo enlace disulfuro, y se produce en forma de una proteína no glicosilada.

Se describe el IFN- τ , y se divulgan secuencias de IFN- τ , p.ej. en la pat. de EE.UU. n° 7.214.367, "Orally-administered interferon-tau compositions and methods".

Se han aprobado una serie de IFN de tipo 1 por la FDA para uso en el tratamiento de enfermedades en seres humanos. La siguiente tabla enumera ejemplos de fármacos de interferón de tipo 1. En realizaciones de la invención, se produce cualquiera de estos fármacos usando los métodos reivindicados en la presente memoria.

Tabla 4. Ejemplos de fármacos de interferón de tipo 1

Nombre genérico	Nombre comercial
Interferón α 2a	Roferon A
Interferón α 2a pegilado	Pegasys
Interferón α 2a pegilado	Reiferon Retard
Interferón α 2b	Intron A/Reliferon
Interferón α 2b pegilado	PegIntron
Interferón α de leucocitos humanos (HuIFN- α -Le)	Multiferon
Interferón β 1a, forma líquida	Rebif
Interferón β 1a	Avonex liofilizado
Interferón β 1b	Betaseron/Betaferon

En realizaciones, se producen variantes y modificaciones de proteínas interferón de tipo 1 usando los métodos de la presente invención. Por ejemplo, se describen variantes de IFN- β en la pat. de EE.UU. n° 6.531.122 "Interferon- β variants and conjugates," y la pat. de EE.UU. n° 7.625.555. Los conjugados incluyen interferones de tipo 1 pegilados, p.ej. los agentes PEGilados mostrados en la Tabla 4, e interferones ligados a restos no peptídicos.

Los métodos de la invención se espera que sean útiles para todos los interferones de tipo 1, debido a sus similitudes estructurales. Se ha encontrado que ciertas proteínas estructuralmente no relacionadas, por ejemplo GCSF humano, son malas candidatas para producir usando los métodos de la invención. Cuando se produjo y se extrajo GCSF usando métodos como se describen en la presente memoria, se extrajo menos de un 5 % de la cantidad de proteína GCSF en la fracción insoluble en forma de proteína soluble (datos no mostrados).

En general, con respecto a una secuencia aminoacídica, el término "modificación" incluye sustituciones, inserciones, alargamientos, deleciones y derivatizaciones solas o en combinación. En algunas realizaciones, los péptidos pueden incluir una o más modificaciones de un residuo aminoacídico "no esencial". En este contexto, un residuo aminoacídico "no esencial" es un residuo que puede alterarse, p.ej. eliminarse o sustituirse, en la secuencia aminoacídica novedosa sin anular ni reducir sustancialmente la actividad (p.ej., la actividad agonista) del péptido (p.ej., el péptido análogo). En algunas realizaciones, los péptidos pueden incluir una o más modificaciones de un

residuo aminoacídico “esencial”. En este contexto, un residuo aminoacídico “esencial” es un residuo que, cuando se altera, p.ej. se elimina o sustituye, en la secuencia aminoacídica novedosa, se reduce sustancialmente o anula la actividad del péptido de referencia. En tales realizaciones, cuando se altera un residuo aminoacídico esencial, el péptido modificado puede poseer una actividad de un interferón de tipo 1 de interés en los métodos proporcionados.

5 Las sustituciones, inserciones y deleciones pueden ser en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden ser en porciones internas de la proteína. A modo de ejemplo, la proteína puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, tanto de manera consecutiva como espaciada a lo largo de la molécula peptídica. Solas o en combinación con las sustituciones, el péptido puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más inserciones, de nuevo de manera consecutiva o espaciada a lo largo de la molécula peptídica. El péptido, solas o en combinación con las sustituciones y/o inserciones, puede incluir también 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más deleciones, de nuevo de manera consecutiva o espaciada a lo largo de la molécula peptídica. El péptido, solas o en combinación con las sustituciones, inserciones y/o deleciones, puede incluir también 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más adiciones aminoacídicas.

15 Las sustituciones incluyen sustituciones aminoacídicas conservativas. Una “sustitución aminoacídica conservativa” es aquella en que el residuo aminoacídico es reemplazado por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral o características fisicoquímicas similares (p.ej., rasgos electrostáticos, de unión a hidrógeno, isostéricos o hidrófobos). Los aminoácidos pueden ser de origen natural o de origen no natural (no naturales). Son conocidas en la materia familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p.ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, metionina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Las sustituciones pueden incluir también cambios no conservativos.

25 **Métodos para seleccionar las condiciones de extracción óptimas**

En realizaciones de la presente invención, se usan los resultados del análisis estadístico expuestos en la Figura 4B para optimizar además las condiciones de extracción dentro de los intervalos de valores de parámetro proporcionados. Se espera observar un alto nivel de producción de proteína soluble de todos los interferones de tipo 1 cuando se practica la invención usando cualquier valor dentro de los intervalos expuestos. No obstante, está dentro de la capacidad de un especialista en la materia utilizar la herramienta representada por la Figura 4B para optimizar las condiciones de extracción para ajustarse a la necesidad en cuestión.

Evaluación del producto

Rendimiento de proteína

35 El rendimiento de proteína en las fracciones insoluble y soluble como se describen en la presente memoria puede determinarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia, por ejemplo por electroforesis en gel capilar (CGE) y análisis de transferencia Western.

40 Las medidas útiles del rendimiento de proteína incluyen, p.ej., la cantidad de proteína recombinante por volumen de cultivo (p.ej., gramos o miligramos de proteína/litro de cultivo), porcentaje o fracción de proteína recombinante medida en el sedimento insoluble obtenido después de lisis (p.ej., cantidad de proteína recombinante en sobrenadante de extracto/cantidad de proteína en la fracción insoluble), porcentaje o fracción de proteína activa (p.ej., cantidad de proteína activa/cantidad de proteína usada en el ensayo), porcentaje o fracción de proteína celular total (tcp), cantidad de proteína/célula y porcentaje de biomasa seca. En realizaciones, la medida del rendimiento de proteína como se describe en la presente memoria está basada en la cantidad de proteína soluble o la cantidad de proteína activa, o ambas, obtenida.

45 En realizaciones, pueden usarse los métodos de la presente invención para obtener un rendimiento de proteína recombinante extraída de aproximadamente 0,3 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro. En ciertas realizaciones, el rendimiento de proteína recombinante extraída es de aproximadamente 0,3 gramos por litro a aproximadamente 1 gramo por litro, de aproximadamente 1 gramo por litro a aproximadamente 2 gramos por litro, de aproximadamente 2 gramos por litro a aproximadamente 3 gramos por litro, de aproximadamente 3 gramos por litro a aproximadamente 4 gramos por litro, de aproximadamente 4 gramos por litro a aproximadamente 5 gramos por litro, de aproximadamente 5 gramos por litro a aproximadamente 6 gramos por litro, de aproximadamente 6 gramos por litro a aproximadamente 7 gramos por litro, de aproximadamente 7 gramos por litro a aproximadamente 8 gramos por litro, de aproximadamente 8 gramos por litro a aproximadamente 9 gramos por litro o de aproximadamente 9 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro. En realizaciones, el rendimiento de proteína extraída es de aproximadamente 1 gramo por litro a aproximadamente 3 gramos por litro, de aproximadamente 2 gramos por litro a aproximadamente 4 gramos por litro, de aproximadamente 3 gramos por litro a aproximadamente 5 gramos por litro, de aproximadamente 4 gramos por litro a aproximadamente 6 gramos por litro, de aproximadamente 5 gramos por litro a aproximadamente 7 gramos por litro, de aproximadamente 6 gramos por litro a aproximadamente 8 gramos por litro, de aproximadamente 7 gramos por litro a aproximadamente 9

gramos por litro o de aproximadamente 8 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro. En realizaciones, el rendimiento de proteína extraída es de aproximadamente 0,5 gramos por litro a aproximadamente 4 gramos por litro, de 1 gramo por litro a aproximadamente 5 gramos por litro, de 2 gramos por litro a aproximadamente 6 gramos por litro, de aproximadamente 3 gramos por litro a aproximadamente 7 gramos por litro, de aproximadamente 4 gramos por litro a aproximadamente 8 gramos por litro, de aproximadamente 5 gramos por litro a aproximadamente 9 gramos por litro o de aproximadamente 6 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro. En realizaciones, el rendimiento de proteína extraída es de aproximadamente 0,5 gramos por litro a aproximadamente 5 gramos por litro, de aproximadamente 1 gramo por litro a aproximadamente 6 gramos por litro, de aproximadamente 2 gramos por litro a aproximadamente 7 gramos por litro, de aproximadamente 3 gramos por litro a aproximadamente 8 gramos por litro, de aproximadamente 4 gramos por litro a aproximadamente 9 gramos por litro o de aproximadamente 5 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro.

En realizaciones, la cantidad de proteína interferón recombinante detectada en la fracción de sobrenadante extraída es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 95 % de la cantidad de proteína interferón recombinante detectada en la fracción insoluble. En realizaciones, esta cantidad es de aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En realizaciones, esta cantidad es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 %, de 20 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 95 % o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 95 %.

El rendimiento de proteína medido en la fracción insoluble no extraída es típicamente mayor que en el sobrenadante de extracto, ya que se pierde material durante el procedimiento de extracción. Los rendimientos de los cultivos de fermentación son típicamente mayores que aquellos de cultivos de HTP menores.

“Porcentaje de proteína celular total” es la cantidad de proteína o polipéptido en la célula hospedadora en forma de porcentaje de proteína celular agregada. La determinación del porcentaje de proteína celular total es bien conocida en la materia.

En realizaciones, la cantidad de proteína interferón detectada en la fracción de sobrenadante extraído producida es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 % de la proteína celular total. En ciertas realizaciones, la proteína recombinante producida es de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 20 % a

aproximadamente 30 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 75 % o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 75 % de la proteína celular total.

Solubilidad y actividad

La “solubilidad” y “actividad” de una proteína, aunque cualidades relacionadas, se determinan generalmente por medios diferentes. La solubilidad de una proteína, particularmente una proteína hidrófoba, indica que los residuos aminoacídicos hidrófobos están localizados inapropiadamente en el exterior de la proteína plegada. La actividad de la proteína, que puede evaluarse usando diferentes métodos, p.ej. como se describe a continuación, es otro indicador de una conformación de proteína apropiada. “Soluble, activa o ambas” como se usa en la presente memoria hace referencia a una proteína que se determina que es soluble, activa o tanto soluble como activa mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia.

Ensayos de actividad de interferón

Los ensayos para evaluar la actividad de proteína interferón son conocidos en la materia e incluyen ensayos de actividad de unión que miden la unión de interferón a un ligando estándar, p.ej. una columna de Blue sepharose o una columna de anticuerpo específica.

La actividad biológica de los interferones puede cuantificarse usando ensayos conocidos, muchos de los cuales están comercialmente disponibles en kits. Se ha mostrado que la mayoría o todas las especies de interferón ejercen un espectro similar de actividades biológicas *in vitro* en células sensibles, a pesar de la existencia de diferentes receptores para IFN de tipo I y tipo II. Las actividades biológicas inducidas por IFN incluyen actividad antivírica, que está mediada por receptores celulares y es dependiente de la activación de rutas de señalización, la expresión de productos génicos específicos y el desarrollo de mecanismos antivíricos. La sensibilidad de las células ante la actividad antivírica mediada por IFN es variable, y depende de una serie de factores que incluyen tipo celular, expresión de receptores de IFN y elementos de respuesta efectores posteriores, eficacia de los mecanismos antivíricos y tipo de virus usado para infectar las células.

Los ensayos de actividad biológica incluyen, p.ej., ensayos de efecto citopático (CPE), ensayos de actividad antivírica, ensayos que miden la inhibición de la proliferación celular, la regulación de las actividades celulares funcionales, la regulación de la diferenciación celular y la inmunomodulación. Los ensayos de gen indicador incluyen el ensayo basado en células indicadoras de luciferasa descrito en la presente memoria en los Ejemplos. En un ensayo de gen indicador, la región promotora de un gen sensible a IFN está ligada con un gen indicador heterólogo, por ejemplo luciferasa de luciérnaga o fosfatasa alcalina, y transfectada a una estirpe celular sensible a IFN. Las estirpes celulares transfectadas establemente expuestas a IFN aumentan la expresión del producto génico indicador en relación directa a la dosis de IFN, siendo la lectura una medida de la acción enzimática de este producto. Están disponibles comercialmente muchas herramientas y kits de ensayo de actividad. Se describen ensayos biológicos para interferones, p.ej., por Meager A, "Biological assays for interferons," 1 Marzo de 2002, J. Immunol. Methods 261(1-2): 21-36.

En realizaciones, la actividad se representa por el % de proteína activa en el sobrenadante de extracto en comparación con la cantidad total ensayada. Esto está basado en la cantidad de proteína que se determina que es activa mediante el ensayo respecto a la cantidad total de proteína usada en el ensayo. En otras realizaciones, la actividad se representa por el % de nivel de actividad de la proteína en comparación con un patrón, p.ej. proteína nativa. Esto está basado en la cantidad de proteína activa en la muestra de extracto de sobrenadante respecto a la cantidad de proteína activa en una muestra patrón (donde se usa la misma cantidad de proteína de cada muestra en el ensayo).

En realizaciones, se determina que es activa de aproximadamente 40 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante. En realizaciones, se determina que es activa aproximadamente al 40 %, aproximadamente al 50 %, aproximadamente al 60 %, aproximadamente al 70 %, aproximadamente al 80 %, aproximadamente al 90 % o aproximadamente al 100 % de la proteína interferón recombinante. En realizaciones, se determina que es activa de aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 90 %, de

aproximadamente 60 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 % o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante.

5 En otras realizaciones, se determina que es activa de aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante. En realizaciones, se determina que es activa de aproximadamente 75 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 %, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 85 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % o de aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante.

15 **Sistemas de expresión**

Se describen métodos para expresar proteínas heterólogas que incluyen secuencias reguladoras útiles (p.ej. promotores, secuencias líderes de secreción y sitios de unión a ribosoma) en células hospedadoras de *Pseudomonas*, así como células hospedadoras útiles en los métodos de la presente invención, p.ej. en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2008/0269070 y la sol. de pat. de EE.UU. n° de serie 12/610.207, ambas tituladas "Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins", la sol. de pat. de EE.UU. n° 2006/0040352, "Expression of Mammalian Proteins in *Pseudomonas Fluorescens*" y la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2006/0110747, "Process for Improved Protein Expression by Strain Engineering". Estas publicaciones describen también estirpes hospedadoras bacterianas útiles en la práctica de los métodos de la invención que se han genomaniplado para sobreexpresar moduladores de plegamiento o en las que se han introducido mutaciones de proteasa para aumentar la expresión de proteína heteróloga. Se describen secuencias líder con detalle en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2008/0193974, "Bacterial leader sequences for increased expression" y la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2006/0008877, "Expression systems with Sec-secretion," así como en la sol. de pat. de EE.UU. n° de serie 12/610.207.

Promotores

30 Los promotores usados de acuerdo con la presente invención pueden ser promotores constitutivos o promotores regulados. Los ejemplos comunes de promotores regulados útiles incluyen aquellos de la familia derivada del promotor lac (concretamente, el promotor lacZ), especialmente los promotores tac y trc descritos en la pat. de EE.UU. n°. 4.551.433 de DeBoer, así como Ptac16, Ptac17, PtaclI, PlacUV5 y el promotor T7lac. En una realización, el promotor no deriva del organismo de la célula hospedadora. En ciertas realizaciones, el promotor deriva de un organismo *E. coli*.

Pueden usarse secuencias promotoras inducibles para regular la expresión de interferones de acuerdo con los métodos de la invención. En realizaciones, los promotores inducibles útiles en los métodos de la presente invención incluyen aquellos de la familia derivada del promotor lac (concretamente el promotor lacZ), especialmente los promotores tac y trc, descritos en la pat. de EE.UU. n° 4.551.433 de DeBoer, así como Ptac16, Ptac17, PtaclI, PlacUV5 y el promotor T7lac. En una realización, el promotor no deriva del organismo de la célula hospedadora. En ciertas realizaciones, el promotor deriva de un organismo *E. coli*.

Los ejemplos comunes de promotores de tipo no lac útiles en sistemas de expresión según la presente invención incluyen, p.ej. aquellos enumerados en la Tabla 5.

Tabla 5. Ejemplos de promotores no lac

Promotor	Inductor
P _R	Alta temperatura
P _L	Alta temperatura
P _m	Alquilbenzoatos o halogenobenzoatos
P _u	Alquiltoluenos o halogenotoluenos
P _{sal}	Salicilatos

45 Véanse, p.ej.: J. Sánchez-Romero y V. De Lorenzo (1999) "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology" (A.

Demain y J. Davies, eds.) pág. 460-74 (ASM Press, Washington, D.C.); H. Schweizer (2001) Current Opinion in Biotechnology, 12: 439-445 y R. Slater y R. Williams (2000 "Molecular Biology and Biotechnology" (J. Walker y R. Rapley, eds.) pág. 125-54 (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, RU)). Puede usarse también un promotor que tiene la secuencia nucleotídica de un promotor nativo de la célula hospedadora bacteriana seleccionada para controlar la expresión del transgén que codifica el polipéptido diana, p.ej. un promotor de operón de antranilato o benzoato de *Pseudomonas* (Pant, Pben). Pueden usarse también promotores en serie en que más de un promotor está enlazado covalentemente con otro, en la misma o diferente secuencia, p.ej. un promotor en serie Pant-Pben (híbrido interpolimérico) o un promotor en serie Plac-Plac, o derivado del mismo o diferentes organismos.

Los promotores regulados utilizan proteínas reguladoras promotoras para controlar la transcripción del gen del que es parte el promotor. Cuando se usa un promotor regulado en la presente memoria, la correspondiente proteína reguladora promotora será también parte de un sistema de expresión según la presente invención. Los ejemplos de proteínas reguladoras promotoras incluyen: proteínas activadoras, p.ej. proteína activadora de catabolito de *E. coli*, proteína MalT; activadores transcripcionales de la familia de AraC; proteínas represoras, p.ej. proteínas Lacl de *E. coli* y proteínas reguladoras de función dual, p.ej. proteína NagC de *E. coli*. Son conocidos en la materia muchos pares de promotor regulado/ proteína reguladora promotora. En una realización, el constructo de expresión para la proteína o proteínas diana y la proteína heteróloga de interés está bajo el control del mismo elemento regulador.

Las proteínas reguladoras promotoras interactúan con un compuesto efector, concretamente un compuesto que se asocia reversible o irreversiblemente con la proteína reguladora para posibilitar que la proteína se libere o se una a al menos una región reguladora de la transcripción de ADN del gen que está bajo el control del promotor, permitiendo o bloqueando así la acción de una enzima transcriptasa en la iniciación de la transcripción del gen. Los compuestos efectores se clasifican como inductores o correpresores, y estos compuestos incluyen compuestos efectores nativos y compuestos inductores gratuitos. Son conocidos en la materia muchos tríos de promotor regulado/proteína reguladora promotora/compuesto efector. Aunque puede usarse un compuesto efector a lo largo del cultivo celular o fermentación, en una realización preferida en que se usa un promotor regulado, después del crecimiento de una cantidad o densidad deseada de biomasa de célula hospedadora, se añade un compuesto efector apropiado al cultivo dando como resultado directo o indirecto la expresión del gen o genes deseados que codifican la proteína o polipéptido de interés.

En realizaciones en las que se utiliza un promotor de la familia lac, puede estar presente también un gen lacl en el sistema. El gen lacl, que es normalmente un gen expresado constitutivamente, codifica la proteína represora de Lac proteína Lacl, que se une al operador lac de los promotores de la familia lac. Por tanto, cuando se utiliza un promotor de la familia lac, puede incluirse también el gen lacl y expresarse en el sistema de expresión.

Se describen en la bibliografía sistemas promotores útiles en *Pseudomonas*, p.ej. en la publ. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2008/0269070, referenciada también anteriormente.

Otros elementos reguladores

En realizaciones, las proteínas solubles están presentes en el citoplasma o periplasma de la célula durante la producción. Las secuencias líder de secreción útiles para orientarse a proteínas se describen en otro lugar de la presente memoria y en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2008/0193974, la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2006/0008877 y en la sol. de pat. de EE.UU. n° de serie 12/610.207, referenciadas anteriormente.

Un constructo de expresión útil en la práctica de los métodos de la presente invención puede incluir, además de la secuencia de codificación de la proteína, los siguientes elementos reguladores ligados operativamente a la misma: un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), un terminador de la transcripción y señales de inicio y terminación traducionales. Pueden obtenerse RBS útiles de cualquiera de las especies útiles como células hospedadoras en sistemas de expresión según, p.ej., la pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° 2008/0269070 y la sol. de pat. de EE.UU. n° de serie 12/610.207. Son conocidos muchos RBS específicos y una variedad de RBS de consenso, p.ej. aquellos descritos y referenciados por D. Frishman *et al.*, Gene 234(2): 257-65 (8 de julio de 1999); y B. E. Suzek *et al.*, Bioinformatics 17(12): 1123-30 (diciembre de 2001). Además, pueden usarse RBS nativos o sintéticos, p.ej. aquellos descritos en: EP 0207459 (RBS sintéticos); O. Ikehata *et al.*, Eur. J. Biochem. 181(3): 563-70 (1989) (secuencia de RBS nativa de AAGGAAG). Se describen ejemplos adicionales de métodos, vectores y elementos de traducción y transcripción y otros elementos útiles en la presente invención, p.ej. en la pat. de EE.UU. n° 5.055.294 de Gilroy y la pat. de EE.UU. n° 5.128.130 de Gilroy *et al.*; la pat. de EE.UU. n° 5.281.532 de Rammner *et al.*; las pat. de EE.UU. n° 4.695.455 y 4.861.595 de Barnes *et al.*; la pat. de EE.UU. n° 4.755.465 de Gray *et al.* y la pat. de EE.UU. n° 5.169.760 de Wilcox.

Estirpes hospedadoras

Se contemplan hospedadores bacterianos, incluyendo *Pseudomonas* y organismos bacterianos estrechamente relacionados, para uso en la práctica de los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora de *Pseudomonas* es de *Pseudomonas fluorescens*. La célula hospedadora puede ser también una célula de *E. coli*.

Pseudomonas y las bacterias estrechamente relacionadas son generalmente parte del grupo definido como "proteobacterias gramnegativas de subgrupo 1" o "bacilos y cocos aeróbicos gramnegativos" (Buchanan y Gibbons

(eds.) (1974) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", pág. 217-289). Se describen estirpes hospedadoras de *Pseudomonas* en la bibliografía, p.ej., en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. nº 2006/0040352, citada anteriormente.

5 Por ejemplo, los hospedadores de *Pseudomonas* pueden incluir las células del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas enalia* (ATCC 14393), *Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375) y *Pseudomonas putrefaciens* (ATCC 8071), que se han reclasificado respectivamente como *Alteromonas haloplanktis*, *Alteromonas nigrifaciens* y *Alteromonas putrefaciens*. De forma similar, p.ej. *Pseudomonas acidovorans* (ATCC 15668) y *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) se han reclasificado desde entonces como *Comamonas acidovorans* y *Comamonas testosteroni*, respectivamente y *Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375) y *Pseudomonas piscicida* (ATCC 15057) se han
10 reclasificado respectivamente como *Pseudoalteromonas nigrifaciens* y *Pseudoalteromonas piscicida*.

La célula hospedadora puede seleccionarse de "proteobacterias gramnegativas de subgrupo 16". Las "proteobacterias gramnegativas de subgrupo 16" se definen como el grupo de proteobacterias de las siguientes especies de *Pseudomonas* (con los números de depósito en la ATCC u otro de la estirpe o estirpes ejemplares mostrados entre paréntesis): *Pseudomonas abietaniphila* (ATCC 700689); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145);
15 *Pseudomonas alcaligenes* (ATCC 14909); *Pseudomonas anguilliseptica* (ATCC 33660); *Pseudomonas citronellolis* (ATCC 13674); *Pseudomonas flavescens* (ATCC 51555); *Pseudomonas mendocina* (ATCC 25411); *Pseudomonas nitroreducens* (ATCC 33634); *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062); *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (ATCC 17440); *Pseudomonas resinovorans* (ATCC 14235); *Pseudomonas straminea* (ATCC 33636); *Pseudomonas agarici* (ATCC 25941); *Pseudomonas alcaliphila*; *Pseudomonas alginovora*; *Pseudomonas andersonii*; *Pseudomonas asplenii* (ATCC 23835); *Pseudomonas azelaica* (ATCC 27162); *Pseudomonas beyerinckii* (ATCC 19372);
20 *Pseudomonas borealis*; *Pseudomonas boreopolis* (ATCC 33662); *Pseudomonas brassicacearum*; *Pseudomonas butanovora* (ATCC 43655); *Pseudomonas cellulosa* (ATCC 55703); *Pseudomonas aurantiaca* (ATCC 33663); *Pseudomonas chlororaphis* (ATCC 9446, ATCC 13985, ATCC 17418, ATCC 17461); *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973); *Pseudomonas lundensis* (ATCC 49968); *Pseudomonas taetrolens* (ATCC 4683); *Pseudomonas cissicola* (ATCC 33616); *Pseudomonas coronafaciens*; *Pseudomonas diterpeniphila*; *Pseudomonas elongata* (ATCC 10144);
25 *Pseudomonas flectens* (ATCC 12775); *Pseudomonas azotoformans*; *Pseudomonas brenneri*; *Pseudomonas cedrella*; *Pseudomonas corrugata* (ATCC 29736); *Pseudomonas extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 35858); *Pseudomonas gessardii*; *Pseudomonas libanensis*; *Pseudomonas mandelii* (ATCC 700871); *Pseudomonas marginalis* (ATCC 10844); *Pseudomonas migulae*; *Pseudomonas mucidolens* (ATCC 4685); *Pseudomonas orientalis*;
30 *Pseudomonas rhodesiae*; *Pseudomonas synxantha* (ATCC 9890); *Pseudomonas tolaasii* (ATCC 33618); *Pseudomonas veronii* (ATCC 700474); *Pseudomonas frederiksbergensis*; *Pseudomonas geniculata* (ATCC 19374); *Pseudomonas gingeri*; *Pseudomonas graminis*; *Pseudomonas grimontii*; *Pseudomonas halodenitrificans*; *Pseudomonas halophila*; *Pseudomonas hibiscicola* (ATCC 19867); *Pseudomonas huttiensis* (ATCC 14670); *Pseudomonas hydrogenovora*; *Pseudomonas jessenii* (ATCC 700870); *Pseudomonas kilonensis*; *Pseudomonas lanceolata* (ATCC 14669); *Pseudomonas lini*; *Pseudomonas marginata* (ATCC 25417); *Pseudomonas mephitica* (ATCC 33665); *Pseudomonas denitrificans* (ATCC 19244); *Pseudomonas pertucinogena* (ATCC 190); *Pseudomonas pictorum* (ATCC 23328); *Pseudomonas psychrophila*; *Pseudomonas filva* (ATCC 31418); *Pseudomonas monteillii* (ATCC 700476); *Pseudomonas mosselii*; *Pseudomonas oryzihabitans* (ATCC 43272); *Pseudomonas plecoglossicida* (ATCC 700383); *Pseudomonas putida* (ATCC 12633); *Pseudomonas reactans*; *Pseudomonas spinosa* (ATCC 14606);
40 *Pseudomonas balearica*; *Pseudomonas luteola* (ATCC 43273); *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 17588); *Pseudomonas amygdali* (ATCC 33614); *Pseudomonas avellanae* (ATCC 700331); *Pseudomonas caricapapayae* (ATCC 33615); *Pseudomonas cichorii* (ATCC 10857); *Pseudomonas ficuserectae* (ATCC 35104); *Pseudomonas fuscovaginae*; *Pseudomonas meliae* (ATCC 33050); *Pseudomonas syringae* (ATCC 19310); *Pseudomonas viridiflava* (ATCC 13223); *Pseudomonas thermocarboxydovorans* (ATCC 35961); *Pseudomonas thermotolerans*; *Pseudomonas thivervalensis*; *Pseudomonas vancouverensis* (ATCC 700688); *Pseudomonas wisconsinensis* y *Pseudomonas xiamenensis*.

La célula hospedadora puede seleccionarse también de "proteobacterias gramnegativas de subgrupo 17". Las "proteobacterias gramnegativas de subgrupo 17" se definen como el grupo de proteobacterias conocido en la materia como "pseudomónadas fluorescentes" que incluye aquellas pertenecientes, p.ej. a las siguientes especies de *Pseudomonas*: *Pseudomonas azotoformans*; *Pseudomonas brenneri*; *Pseudomonas cedrella*; *Pseudomonas corrugata*; *Pseudomonas extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas gessardii*; *Pseudomonas libanensis*; *Pseudomonas mandelii*; *Pseudomonas marginalis*; *Pseudomonas migulae*; *Pseudomonas mucidolens*;
50 *Pseudomonas orientalis*; *Pseudomonas rhodesiae*; *Pseudomonas synxantha*; *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas veronii*.

55 Optimización de codón

Los métodos para optimizar codones para mejorar la expresión en hospedadores bacterianos son conocidos y la materia y se describen en la bibliografía. Por ejemplo, se describe la optimización de codones para expresión en una estirpe hospedadora de *Pseudomonas*, p.ej., en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. nº.2007/0292918, "Codon Optimization Method".

60 Se describe la optimización de codón para expresión en *E. coli*, p.ej., en Welch, et al., 2009, PLoS One, "Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in Escherichia coli", 4(9): e7002, Ghane, et al., 2008,

"Overexpression of Biologically Active Interferon β Using Synthetic Gene in *E. coli*", Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 19(3): 203-209 y Valente, *et al.*, 2004, "Translational Features of Human Alpha 2b Interferon Production in *Escherichia coli*," Applied and Environmental Microbiology 70(8): 5033-5036.

Formato de fermentación

5 El sistema de expresión según la presente invención puede cultivarse en cualquier formato de fermentación. Por ejemplo, pueden emplearse en la presente memoria los modos de fermentación por lotes, alimentado por lotes, semicontinuo y continuo.

10 En realizaciones, el medio de fermentación puede seleccionarse de entre medios ricos, medios mínimos y medios de sales minerales. En otras realizaciones, se selecciona un medio mínimo o un medio de sales minerales. En ciertas realizaciones, se selecciona un medio de sales minerales.

15 Los medios de sales minerales consisten en sales minerales y una fuente de carbono tal como, p.ej., glucosa, sacarosa o glicerol. Los ejemplos de medios de sales minerales incluyen, p.ej., medio M9, medio de *Pseudomonas* (ATCC 179) y medio de Davis y Mingioli (véase, B D Davis y E S Mingioli (1950) J. Bact. 60: 17-28). Las sales minerales usadas para preparar medios de sales minerales incluyen aquellas seleccionadas de entre, p.ej., fosfatos de potasio, sulfato o cloruro de amonio, sulfato o cloruro de magnesio y oligominerales tales como cloruro de calcio, borato y sulfatos de hierro, cobre, manganeso y cinc. Típicamente, no se incluye una fuente de nitrógeno orgánico, tal como peptona, triptona, aminoácidos o un extracto de levadura, en un medio de sales minerales. En lugar de ello, se usa una fuente de nitrógeno inorgánico y esta puede seleccionarse de entre, p.ej., sales de amonio, amoniaco acuoso y amoniaco gaseoso. Un medio de sales minerales contendrá típicamente glucosa o glicerol como fuente de carbono. En comparación con los medios de sales minerales, los medios mínimos pueden contener también sales minerales y una fuente de carbono, pero pueden suplementarse, p.ej., con bajos niveles de aminoácidos, vitaminas, peptonas u otros ingredientes, aunque estos se añaden a niveles muy bajos. Los medios pueden prepararse usando los métodos descritos en la materia, p.ej. en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. nº 2006/0040352, referenciada anteriormente. Se describen detalles de los procedimientos de cultivo y los medios de sales minerales útiles en los métodos de la presente invención por Riesenber, D *et al.*, 1991, "High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate," J. Biotechnol. 20(1): 17-27.

25 La fermentación puede efectuarse a cualquier escala. Los sistemas de expresión según la presente invención son útiles para la expresión de proteína recombinante a cualquier escala. Por tanto, p.ej., pueden usarse volúmenes de fermentación a escala de microlitro, escala de centilitro y escala de decilitro, y pueden usarse volúmenes de fermentación a escala de 1 l y mayores.

30 En realizaciones, el volumen de fermentación es de o por encima de aproximadamente 1 litro. En realizaciones, el volumen de fermentación es de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros. En realizaciones, el volumen de fermentación es de aproximadamente 1 litro, aproximadamente 2 litros, aproximadamente 3 litros, aproximadamente 4 litros, aproximadamente 5 litros, aproximadamente 6 litros, aproximadamente 7 litros, aproximadamente 8 litros, aproximadamente 9 litros o aproximadamente 10 litros. En realizaciones, el volumen de fermentación es de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 5 litros, de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 10 litros, de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 25 litros, de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 50 litros, de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 75 litros, de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 25 litros, de aproximadamente 25 litros a aproximadamente 50 litros o de aproximadamente 50 litros a aproximadamente 100 litros. En otras realizaciones, el volumen de fermentación es de o por encima de 5 litros, 10 litros, 15 litros, 20 litros, 25 litros, 50 litros, 75 litros, 100 litros, 200 litros, 500 litros, 1.000 litros, 2.000 litros, 5.000 litros, 10.000 litros o 50.000 litros.

35 Aunque se han mostrado y descrito en la presente memoria realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los especialistas en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones a los especialistas en la materia. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones estén cubiertos por las mismas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de rIFN- β a partir de muestras de expresión de alto rendimiento

40 En el siguiente experimento, se construyeron estirpes de expresión de IFN- β C17S y se cuantificó la cantidad de IFN- β en la fracción insoluble obtenida para cada una. Basándose en los datos resultantes, se seleccionaron ciertas estirpes para uso en la optimización del proceso de extracción no desnaturalizante en el método de la presente invención.

Construcción y crecimiento de estirpes de expresión de IFN- β

55 Se construyó la secuencia de codificación de IFN- β 1b usando los codones preferidos de *P. fluorescens* que codifican la secuencia aminoacídica de IFN- β humano correspondiente a Betaseron terapéutico. La Figura 7 muestra

las secuencias aminoacídica y de ADN del gen de IFN- β (Betaseron) sintético.

Se construyeron plásmidos que portan el IFN- β optimizado de codón fusionado con diecinueve secuencias líder de secreción de *P. fluorescens*. Se incluyeron las secuencias líder para orientar la proteína al periplasma, donde puede recuperarse en la forma apropiadamente plegada y activa. Además, se construyó un plásmido que porta el IFN- β optimizado de codón diseñado para expresión citoplásmica.

Se impulsó la expresión de IFN- β por el promotor Ptac y se inició la traducción por un sitio de unión a ribosoma (RBS) de alta (Hi) o media (Med) actividad. Se transformaron los 20 plásmidos resultantes en 30 estirpes hospedadoras de *P. fluorescens* (16 estirpes con delección de proteasa, 13 estirpes con sobreexpresión de modulador de plegamiento y 1 estirpe de tipo silvestre), produciendo 600 estirpes de expresión (véanse las Tablas 6 y 7). Los moduladores de plegamiento, cuando están presentes, se codificaban en un segundo plásmido y se impulsaba la expresión por un promotor inducible por manitol.

Se hicieron crecer las treinta estirpes hospedadoras portadoras cada una de los 20 plásmidos de expresión de IFN- β (600 hospedadores de expresión en total) por triplicado en placas de 96 pocillos. Se usaron para análisis muestras recolectadas 24 horas después de la inducción.

15 **Expresión de IFN- β usando la tecnología de expresión Pfenex en formato de 96 pocillos**

Se transformó cada plásmido (Tabla 6) en 30 estirpes hospedadoras de *P. fluorescens* (Tabla 7) como sigue: se descongelaron 25 microlitros de células competentes y se transfirieron a una placa de electroporación de 96 pocillos (electroporador BTX ECM630) y se añadió 1 microlitro de ADN de plásmido Miniprep a cada pocillo. Se electroporaron las células a 2,5 kV, 200 Ohm y 25 μ F. Se resuspendieron las células en 75 microlitros de medios HTP-YE con oligominerales, se transfirieron a una placa de 96 pocillos profundos con 500 μ l de medio de glucosa al 1 % con sales M9 (cultivo de semilla) y se incubaron a 30 °C, agitando a 300 rpm y 50 mm de diámetro de carrera durante 48 horas.

Se transfirieron diez microlitros de cultivo de semilla a pocillos por triplicado de placas de 96 pocillos profundos, conteniendo cada pocillo 500 microlitros de medio HTP-YE, y se incubaron como antes durante 24 horas. Se añadió β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) a cada pocillo para una concentración final de 0,3 mM para inducir la expresión de IFN- β . Para el crecimiento de cultivos pequeños en micropocillos de HTP, el pH de cultivo específico no está estrechamente controlado y la densidad celular puede diferir ligeramente de pocillo a pocillo. Se añadió manitol (Sigma, M1902) a cada pocillo a una concentración final del 1 % para inducir la expresión de moduladores de plegamiento en estirpes que sobreexpresan modulador de plegamiento, y se redujo la temperatura a 25 °C. Veinticuatro horas después de la inducción, se recogieron los cultivos para análisis. Para normalización de la DO, se mezclaron las células con 1x PBS estéril para obtener una DO₆₀₀ final= 20 en un volumen final de 400 microlitros usando la estación de manipulación de líquidos Biomek (Beckman Coulter). Se recogieron las muestras en gradillas para microtubos.

Preparación de muestra y análisis de CGE-SDS

Se prepararon fracciones solubles (sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación de lisados) y fracciones insolubles (sedimentos obtenidos después de la centrifugación de lisados) por sonicación de cultivos de DO normalizada, seguido de centrifugación. Se descongeló caldo de cultivo normalizado congelado (400 microlitros) y se sometió a sonicación durante 3,5 minutos. Se centrifugaron los lisados a 20.800 x g durante 20 minutos (4 °C) y se retiraron las fracciones solubles usando manipulación de líquidos manual o automatizada. Se congelaron las fracciones insolubles y se descongelaron entonces para recentrifugación a 20.080 x g durante 20 minutos a 4 °C, retirando el sobrenadante residual. Se resuspendieron entonces las fracciones insolubles en 400 μ l de 1x solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Se efectuaron diluciones adicionales de las fracciones solubles e insolubles para análisis de CGE-SDS en 1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Se prepararon las fracciones solubles e insolubles para análisis por electroforesis en gel capilar (CGE) con SDS (Caliper Life Sciences, kit Protein Express LabChip, pieza 760301), en presencia de ditioneitol (DTT).

Se analizaron las fracciones soluble e insoluble normalizadas de cada pocillo de las 600 estirpes que expresan IFN- β mediante análisis de CGE-SDS reductor en un duplicado para las fracciones solubles y las fracciones insolubles. No se detectó señal de IFN- β en las fracciones solubles. La señal de IFN- β variaba de sin señal a más de 400 mg/l en las fracciones insolubles. Solo cinco de los veinte plásmidos ensayados mostraba una señal mensurable de IFN- β en las fracciones insolubles de todas las treinta estirpes hospedadoras: p530-001, p530-007, p530-011, p530-018 y p530-020. Se efectuó la integración de valle a valle de la señal de IFN- β usando el software Caliper LabChipGX en las 150 estirpes consistentes en los cinco plásmidos enumerados anteriormente en las treinta estirpes hospedadoras, y se usaron los datos para calcular rendimientos volumétricos. Los rendimientos volumétricos de las 150 estirpes analizadas oscilaban de 2 a 482 mg/l. Las estirpes portadoras de p530-020 alcanzaban rendimientos de IFN- β en la fracción insoluble consistentemente superiores a otras estirpes de expresión; sin embargo, la proteína migraba más de lo esperado en CGE-SDS, indicando que la secuencia líder de secreción no se escindía. Se observaron también altos rendimientos con 2 estirpes hospedadoras portadoras de p530-001. No se observó una diferencia significativa de IFN- β en la fracción insoluble entre las 30 estirpes, excepto potencialmente en una estirpe,

DC441, una estirpe de delección de la proteasa lon hslUV, que mostraba rendimientos algo mayores que las otras 29 estirpes.

5 Se seleccionó un subconjunto de 17 estirpes de expresión superior (Tabla 8), excluyendo las estirpes que contienen el plásmido p530-020, para análisis adicionales. Se excluyeron las estirpes de expresión que contienen el plásmido p530-020 de consideraciones adicionales en este experimento debido a la secuencia líder potencialmente no procesada. Se efectuó el análisis de CGE-SDS en las fracciones soluble e insoluble para estas estirpes. Se muestra la cuantificación del resultado de CGE-SDS en la Tabla 8. La concentración de proteína IFN-β oscilaba de 102 a más de 482 mg/l. Basándose en el rendimiento insoluble y el procesamiento de la secuencia líder periplásmica o la Met N-terminal de IFN-β, se eligieron las estirpes para proceder a la valoración de la fermentación.

10 Tabla 6. Plásmidos

Plásmido	Vector de expresión	Secuencia líder de secreción	RBS
p530-001	pDOW5271	Ninguna	Hi
p530-002	pDOW5204	Pbp	Med
p530-003	pDOW5206	DsbA	Hi
p530-004	pDOW5207	DsbA	Med
p530-005	pDOW5209	Azu	Hi
p530-006	pDOW5210	Azu	Med
p530-007	pDOW5217	LAO	Hi
p530-008	pDOW5220	Ibp-S31A	Hi
p530-009	pDOW5223	TolB	Hi
p530-010	pDOW5226	Trc	Hi
p530-011	pDOW5232	Ttg2C	Hi
p530-012	pDOW5235	FlgI	Hi
p530-013	pDOW5238	CupC2	Hi
p530-014	pDOW5241	CupB2	Hi
p530-015	pDOW5244	CupA2	Hi
p530-016	pDOW5247	NikA	Hi
p530-017	pDOW5256	PorE	Hi
p530-018	pDOW5259	Pbp-A20V	Hi
p530-019	pDOW5262	DsbC	Hi
p530-020	pDOW5265	Bce	Hi

Tabla 7. Estirpes de expresión de IFN-β

Nombre de estirpe	Descripción de estirpe	Nombre de estirpe	Descripción de estirpe
DC454	Tipo silvestre	DC539	FMO
DC441	PD	DC544	FMO
DC462	FMO	DC547	FMO
DC468	PD	DC548	FMO
DC469	PD	DC552	FMO
DC485	PD	DC565	FMO
DC486	PD	DC566	FMO
DC487	PD	DC567	FMO
DC488	PD	DC568	FMO
DC489	PD	DC575	FMO
DC490	PD	DC584	FMO
DC491	PD	DC598	FMO
DC492	PD	DC599	FMO
DC498	PD	DC667	FMO
DC538	FMO	DC954	PD

PD= estirpe de delección de proteasa, FMO= estirpe de sobreexpresión de modulador de plegamiento

5 Tabla 8. Rendimientos de IFN-β volumétricos calculados de las 17 estirpes superiores por CGE-SDS

Nombre de est.	Rend. vol. >100 ug/ml	Plásmido	Est. hosp.	S. líder
PS530-001	482,3	p530-001	DC441	x
PS530-101	216,5	p530-001	DC485	x
PS530-011	161,1	p530-011	DC441	ttg2C
PS530-071	148,8	p530-011	DC468	ttg2C
PS530-007	141,2	p530-007	DC441	Lao
PS530-031	131,3	p530-011	DC454	ttg2C
PS530-201	122,6	p530-001	DC490	x
PS530-531	121,0	p530-011	DC598	ttg2C
PS530-211	119,8	p530-011	DC490	ttg2C
PS530-151	119,8	p530-011	DC487	ttg2C
PS530-061	119,6	p530-001	DC468	x
PS530-411	114,0	p530-011	DC565	ttg2C
PS530-231	113,3	p530-011	DC491	ttg2C
PS530-391	112,2	p530-011	DC552	ttg2C
PS530-027	104,5	p530-007	DC454	Lao
PS530-291	103,3	p530-011	DC538	ttg2C
PS530-271	102,2	p530-011	DC498	ttg2C

Ejemplo 2. Extracción de IFN-β 1b de material de expresión de alto rendimiento

Se extrajo exitosamente IFN-β 1b de fracciones insolubles de cultivos de expresión de HTP usando condiciones de expresión que comprenden el detergente Zwittergent 3-14.

Se sometieron a sonicación los cultivos de placa de expresión de HTP de *Pseudomonas fluorescens* de estirpes PS530-001, que sobreexpresa IFN-β 1b citoplasmático, y 530-220, que sobreexpresa IFN-β 1b secretado (descrito en el Ejemplo 1), y se centrifugaron, obteniendo una fracción insoluble y una fracción soluble. Se resuspendieron los sedimentos en tampón de extracción 1x PBS, pH 7,4 o acetato de sodio a pH 4,5. Se ensayó cada tampón con o sin detergente Zwittergent 3-14 al 1 % (p/v). Se incubó cada una de las cuatro combinaciones de tampón y detergente durante 1-2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C con agitación. Después de la extracción, se centrifugó cada muestra durante 20 minutos a 20.080 x g a 4 °C, produciendo una segunda fracción de sedimento insoluble (sedimento de extracto) y una segunda fracción de sobrenadante soluble (sobrenadante de extracto). Se analizaron por CGE-SDS la primera fracción insoluble y la primera fracción soluble y la fracción de sedimento de extracto y la fracción de sobrenadante de extracto. Se muestran los resultados en las Figuras 1A y 1B. Como se ve en el carril 7, la condición de extracción que incluye tampón PBS y Zwittergent 3-14 facilitaba IFN-β soluble.

Ejemplo 3. Optimización de las condiciones para extracción

Se extrajeron las fracciones insolubles de los cultivos de fermentación en condiciones que comprenden diferentes detergentes.

Se resuspendió pasta celular congelada de una fermentación de 1 l (crecida a 32 °C, pH 6,5 e inducida usando IPTG 0,2 mM a una DO₅₇₅ de 100) de la estirpe PS530-001, que sobreexpresa IFN-β 1b recombinante, en tampón de lisis que contiene fosfato de sodio 20 mM (JT Baker), pH 7,4 a una concentración de sólidos final del 20 % (p/v). Se lisó la suspensión celular bien mezclada con dos pasadas a 262 MPa (38 kpsi) a través de un disruptor celular de Constant (Constant Systems, Inc.). Se dividió el lisado en dos y se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C (Beckman Coulter, PN nº J-20, XPF). Se resuspendieron los sedimentos (que contienen IFN-β y desechos celulares) y se lavó cada uno con tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4) o tampón B (acetato de sodio 20 mM, pH 4,0). Se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones descritas para la primera centrifugación, se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron de nuevo los sedimentos en tampón A o B a una concentración de sólidos del 20 %. Para cada tampón, se dispusieron entonces veinte alícuotas de 1 ml cada una en tubos cónicos de 1,5 ml. Se añadieron soluciones madre de detergente a los tubos cónicos a diferentes concentraciones. Se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora o durante una noche (18 horas) a 4 °C con mezclado continuo. Después de la extracción, se centrifugaron las soluciones y se analizó en las fracciones de sobrenadante de extracto la concentración de proteína por CGE-SDS. La Figura 2 proporciona un diagrama de flujo que muestra cómo se llevaron a cabo la preparación de muestra y la extracción.

De los detergentes ensayados, se encontró que Zwittergent 3-14 y N-lauroilsarcosina (NLS) daban los mejores rendimientos independientemente del tampón y del tiempo de incubación (Tabla 9). Son embargo, el producto extraído usando NLS no era activo, como se determina por su incapacidad de unirse a una columna de afinidad de Blue Sepharose o a una columna de intercambio catiónico (SP HP) (datos no mostrados). Se determinó que el producto extraído usando Zwittergent 3-14 era activo.

Tabla 9. Evaluación de los detergentes para extracción

Detergente	Concentración de detergente (p/v)	Concentración de producto extraído (ug/ml)			
		Tampón A		Tampón B	
		1 h a TA	18 h a TA	1 h a TA	18 h a TA
Zwittergent 3-14	0,50 %	748	557	1011	734
	1,00 %	731	392	1060	936
	2,00 %	903	398	1548	1146
Lauroilsarcosina	0,20 %	1023	643	NA	NA
	0,50 %	3104	2125	324	150
	1,50 %	2782	2670	2319	2668
NDSB195	10,00 %	8	6	11	46

	15,00 %	14	13	31	119
NDSB256	5,00 %	20	56	15	43
	15,00 %	204	233	114	135
Chaps	0,50 %	11	36	98	160
	2,00 %	75	170	179	250
Glucopiranosido de octilo	1,00 %	83	175	121	169
	5,00 %	196	258	164	215
Desoxicolato de sodio	0,50 %	129	237	NA	NA
	1,00 %	196	274	NA	NA
Tween-20	0,05 %	4	11	NA	6
	0,50 %	11	37	3	18
Tween-80	0,01 %	4	6	NA	7
	0,10 %	5	10	NA	12
	0,50 %	7	25	3	21
Triton-100	0,10 %	25	68	33	103
	1,00 %	40	85	62	176

Evaluación de los análogos Zwittergent

5 Usando métodos similares, se evaluó en los análogos Zwittergent su eficacia de extracción. Se muestran los resultados en la Tabla 10. Se observaron los mejores rendimientos con Zwittergent 3-14. Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-10 y Zwittergent 3-08 eran también eficaces.

Tabla 10. Evaluación de los análogos Zwittergent para la extracción de IFN- β 1b

Detergente	Conc. de detergente	Conc. de sólidos	Proteína (ug/ml)
Zwittergent 3-08	10 %	20 %	292
Zwittergent 3-10	1,0 %	20 %	233
Zwittergent 3-12	1,0 %	20 %	357
Zwittergent 3-16	0,1 %	20 %	17
Zwittergent 3-14	1,0 %	20 %	430
Zwittergent 3-14	1,0 %	10 %	396
Zwittergent 3-14	1,0 %	5 %	548

Evaluación de la concentración de Zwittergent 3-14

10 Para solubilizar eficazmente proteínas, la concentración de detergente necesita ser típicamente superior a su valor de CMC. La CMC de Zwittergent 3-14 es de aproximadamente 0,01% p/v. Se evaluaron condiciones de extracción que incluyen tampón fosfato de sodio a pH 7,4 con concentraciones crecientes de Zwittergent 3-14. Se obtuvo la pasta celular haciendo crecer la estirpe PS530-001 at 32 °C, pH 6,5, y se indujo usando IPTG 0,2 mM a una DO₅₇₅ de 100. Los resultados de la Tabla 11 muestran que el uso de Zwittergent 3-14 a una concentración del 1 % (p/v) daba como resultado el mayor rendimiento de extracción.

15

Tabla 11: Efecto de la concentración de Zwittergent 3-14 sobre la extracción de IFN-β 1b

Zwittergent 3-14 en concentración (% p/v)	Rendimiento de extracción en microgramos/ml	Rendimiento de extracción en % de proteína IFN-β extraída del sedimento insoluble (fracción insoluble)
0,01 %	10	0 %
0,05 %	36	1 %
0,10 %	72	2 %
0,50 %	341	9 %
1,00 %	787	21 %
2,00 %	620	17 %

Evaluación de reactivos químicos adicionales

5 Como se muestra en la Tabla 11, las condiciones de extracción que incluyen Zwittergent 3-14 al 1 % (p/v) en tampón fosfato de sodio a pH 7,4 facilitaban un 21 % del IFN-β 1b detectado en la fracción insoluble original. Se realizó una optimización adicional.

10 Se ha usado comúnmente una alta concentración (p.ej. 6 a 8 M) de algunos reactivos caotrópicos como urea e hidrocloreuro de guanidinio como desnaturizante fuerte para la solubilización de cuerpos de inclusión. Los caótropos tales como urea pueden aumentar la concentración micelar crítica (CMC) del detergente y pueden mejorar potencialmente la eficacia de extracción. Se evaluaron bajas concentraciones de urea (hasta 2 M) en las condiciones de extracción. Las sales, p.ej. NaCl, pueden afectar también a la CMC del detergente. Se evaluó la variación de las concentraciones de Zwittergent 3-14 debido a la interacción potencial entre la CMC del detergente y la presencia de reactivos caotrópicos y sales. Se varió también la concentración de sólidos de inclusión insolubles en las condiciones de extracción. Se evaluaron también concentraciones de sólidos menores del 20 % (p/v) usada anteriormente.

15 En resumen, se ensayó el efecto de variar los siguientes parámetros sobre la eficacia de extracción.

Cloruro de sodio: 150-1850 mM

Urea: 0-2 M

Zwittergent 3-14: 0,1-1,0 % p/v

20 Sólidos: 5-20 % p/v

pH: 6,5-8,5

25 El diagrama de flujo en la Figura 3 describe la preparación y extracción de la primera fracción de sedimento insoluble para este estudio de optimización. La Tabla 12 muestra los resultados del estudio. Las Figuras 4A y B resumen los resultados y significación del efecto de cada parámetro sobre el rendimiento de extracción. Para la optimización de la extracción de interferón β a partir de la fracción insoluble, se usó un diseño experimental factorial semifraccionado de cinco factores a dos niveles. Se usó el software JMP (SAS Institute, Cary, NC) para diseño experimental y análisis. El software estima el efecto de factores individuales así como las interacciones sobre el resultado experimental (cantidad de interferón extraído).

Tabla 12. Resultados del estudio de extracción

Nº	Sólidos (%)	pH	NaCl (M)	Urea (M)	Z314 (%)	Interferón β en sobrenadante de extracto (mg/l)	
1	----+	5	6,5	0,15	0	1	2275
2	---+-	5	6,5	0,15	2	0,1	896
3	--+--	5	6,5	1,85	0	0,1	246
4	----+	5	6,5	1,85	2	1	7024

ES 2 639 398 T3

5	-+---	5	8,5	0,15	0	0,1	638
6	-+---	5	8,5	0,15	2	1	5614
7	-+++	5	8,5	1,85	0	1	5414
8	-+++	5	8,5	1,85	2	0,1	1711
9	0	12,5	7,5	1	1	0,55	3362
10	0	12,5	7,5	1	1	0,55	3693
11	0	12,5	7,5	1	1	0,55	3809
12	+---	20	6,5	0,15	0	0,1	65
13	+---	20	6,5	0,15	2	1	2345
14	+--+	20	6,5	1,85	0	1	2149
15	+---	20	6,5	1,85	2	0,1	438
16	+--+	20	8,5	0,15	0	1	2350
17	+--+	20	8,5	0,15	2	0,1	677
18	+++--	20	8,5	1,85	0	0,1	199
19	+++++	20	8,5	1,85	2	1	4486

Basándose en los datos anteriores, se seleccionó una condición de extracción optimizada para los experimentos descritos en adelante: Zwittergent 3-14 al 1 % (p/v), urea 2 M, NaCl 2 M, sólidos al 5 % p/v, pH de tampón de 7,5 a 8,5. Usando estas condiciones optimizadas, se encontró que el rendimiento de extracción observado (en el sobrenadante de extracto) era consistentemente del 90 % o superior (concretamente, del 90 % o más de la cantidad de proteína recombinante medida en la fracción insoluble).

Ejemplo 4. Producción de rIFN- β 1b de fermentación a gran escala

Se consiguió exitosamente la producción de proteína interferón β humano recombinante (IFN- β 1b) en la estirpe PS530-001 de *Pseudomonas fluorescens* con Pfenex Expression Technology™ en fermentadores de 2 l. Se evaluaron múltiples condiciones de fermentación que dan como resultado la expresión de IFN- β 1b hasta 9,2 g/l.

Se hicieron crecer cultivos de fermentación en fermentadores de 2 l que contienen un medio de sales minerales (como se describe en la presente memoria y también, p.ej., por Riesenberg, D., *et al.*, 1991). Se mantuvieron las condiciones de cultivo a 32 °C y pH 6,5 mediante la adición de amoníaco acuoso. Se mantuvo oxígeno disuelto en exceso mediante aumentos en la agitación y el flujo de aire y oxígeno burbujeados al fermentador. Se suministró glicerol al cultivo a través de la fermentación para mantener niveles en exceso. Se mantuvieron estas condiciones hasta alcanzar la densidad óptica de cultivo diana (A575) para inducción, en cuyo momento se añadió IPTG para iniciar la producción de IFN- β . Se variaron todos de densidad óptica en la inducción, concentración de IPTG, pH y temperatura para determinar las condiciones óptimas para la expresión. Después de 24 horas, se recolectó el cultivo de cada fermentador por centrifugación y se congeló el sedimento celular a -80 °C.

Se indujeron los cultivos de fermentación a una DO₅₇₅ de 100 usando IPTG 0,2 mM a pH 6,5 y una temperatura de 32 °C. Las fermentaciones duplicadas dieron como resultado una producción de IFN- β de 7,5, 8,4 y 7,9 g/l determinada por CGE-SDS de la fracción insoluble inicial (Figura 5). Cuando se sometieron estas fracciones insolubles a extracción (en condiciones que incluyen Zwittergent 3-14 al 1 % (p/v), urea 2 M, NaCl 2 M, sólidos al 5 % p/v y pH de tampón 8,2), se observaron IFN- β solubilizados en el sobrenadante de extracto a 2,2, 2,4 y 2,6 g/l. Esto representa un rendimiento medio de extracción del 31 %.

Aumentar la DO de inducción a 120 a 160 y disminuir el pH de la fermentación a 5,7 a 6,25 aumentaba los títulos de IFN- β en la fracción insoluble inicial a 8,8-9,2 g/l (Figura 6). La extracción de estos sedimentos celulares (usando las mismas condiciones de extracción que para el experimento mostrado en la Figura 5) daba como resultado de 3,1 a 4,0 g/l de IFN- β en la fracción de sobrenadante extraída, un rendimiento medio de extracción del 39 % (Tabla 13).

Tabla 13. IFN-β solubilizado extraído basado en las condiciones de inducción

	DO de inducción de 100 y pH 6,5			DO de inducción de 120-160 y pH de 5,7 a 6,25			
	Título insoluble total (g/l)	Título solubilizado extraído (g/l)	Rendimiento extraído (%)	Título insoluble total (g/l)	Título solubilizado extraído (g/l)	Rendimiento extraído (%)	
u2	7,5	2,2	29	u2	9,2	4,0	43
u7	8,4	2,4	29	u3	8,8	3,1	35
u8	7,9	2,6	33	u5	8,8	ND	ND
Media	7,9	2,4	31	Media	8,9	3,5	39
Desv. est.	0,4	0,2	2,3	Desv. est.	0,3	0,6	5,6

Ejemplo 5. Análisis de actividad del producto de extracción de IFN-β

5 Se centrifugó caldo de fermentación de la estirpe PS530-001 de *Pseudomonas fluorescens* (1 l de fermentación a 32°C, pH 6,0, inducida a una DO₅₇₅ de 100 usando IPTG 0,2 mM) y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió la pasta celular en Tris 20 mM, pH 8,2 (a una relación de 1:4) y se lisó pasando a través de un microfluidizador de Microfluidics M110Y a 103,4 MPa (15.000 psi). Se centrifugó el lisado y se desechó la fracción soluble. Se mezcló la fracción insoluble con tampón de extracción (Tris 20 mM, NaCl 2 M, urea 2 M, 1 % de Zwittergent 3-14, pH 8,2) a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó, produciendo una fracción de sobrenadante de extracto y una fracción de sedimento de extracto. El rendimiento de extracción de IFN-β (IFN-β en la fracción de sobrenadante de extracto/IFN-β en la fracción insoluble inicial) era cercano al 100 % (> 99 %) basándose en el análisis de CGE-SDS (datos no mostrados).

15 Se filtró el sobrenadante de extracto y se cargó en una columna de 5 ml de Blue Sepharose de GE Healthcare equilibrada con Tris 20 mM, NaCl 2 M, pH 8,2. Se lavó la columna con el mismo tampón y se eluyó el IFN-β con Tris 20 mM, NaCl 2 M, 50 % de propilenglicol, pH 8,2. Se analizó la proteína en el conjunto de elución por CGE-SDS y se encontró que era IFN-β puro a más del 98 %. Se intercambiaron alcuotas del conjunto de elución por tampones C (glicina 5 mM a pH 3,0) y D (ácido aspártico 5 mM, 9 % de trehalosa, pH 4,0).

20 Se analizaron las muestras intercambiadas por CGE-SDS así como con un ensayo basado en células (PBL Interferon Source, nº 51100-1). El ensayo basado en células usa una estirpe celular humana (PIL5) sensibilizada con receptor de IFN de tipo 1. El IFN-β se une al receptor, que envía una señal a través de la ruta de transducción de señal Jak1/STAT1, activando la transcripción de ISG15-luciferasa a través del elemento de respuesta sensible a interferón (ISRE). Se siguieron las instrucciones del kit basado en células según el protocolo del fabricante (51100 rev01). Se leyó la señal usando lectores de placa convencionales con detección de luminiscencia. La Tabla 14 resume los resultados de la CGE-SDS y el ensayo basado en células, que indican que la IFN-β en las muestras estaba totalmente activa.

25 Tabla 14. Resultados de los ensayos de actividad

Muestra	CGE-SDS (mg/l)	Ensayo basado en células (mg/l)
Conjunto de elución en Blue-Sepharose en el tampón de intercambio A	436	477
Conjunto de elución en Blue-Sepharose en el tampón de intercambio B	404	404

Ejemplo 6. Producción de IFN-α 2a y 2b a partir de muestras de expresión de alto rendimiento

30 Se construyeron secuencias de codificación de IFN-α 2a e IFN-α 2b usando los codones preferidos por *P. fluorescens* para codificar proteínas humanas. La Figura 8 muestra las secuencias aminoacídica y de ADN del gen de IFN-α 2a sintético, y la Figura 9 muestra las secuencias aminoacídica y de ADN del gen de IFN-α 2b sintético.

Se construyeron plásmidos que expresan cualquier proteína y se transformaron en diferentes estirpes hospedadoras. Se ensayó en las estirpes de expresión su capacidad de expresar proteína recombinante usando análisis de HTP, como se describe con respecto a IFN-β en la presente memoria. Se selecciona un subconjunto de

estirpes de expresión para estudios de fermentación.

5 Se hicieron crecer las estirpes seleccionadas y se indujeron según la presente invención. Se centrifugaron las células, se lisaron y se centrifugaron de nuevo como se describe en la presente memoria para IFN- β . Se extrajeron la fracción insoluble y la primera fracción soluble resultantes usando condiciones de extracción descritas en la presente memoria. Se cuantificaron en los sobrenadantes de extracto los IFN- α 2a e IFN- α 2b resultantes usando CGE-SDS (datos no mostrados).

Ejemplo 7. Extracción de IFN- α 2a y 2b a partir de material de expresión de alto rendimiento

10 Se extrae la primera fracción insoluble obtenida como se describe en el Ejemplo 6 usando las condiciones de extracción de la presente invención. Se evalúan IFN- α 2a y 2b en las segundas fracciones solubles por CGE y ensayo de bioactividad.

Ejemplo 8. Producción de IFN- α 2a y 2b a partir de fermentación a gran escala

15 Se hacen crecer estirpes que expresan IFN- α 2a y 2b seleccionadas por análisis de HTP en fermentadores de 2 litros usando condiciones de fermentación optimizadas de la presente invención, p.ej. como se describen en el Ejemplo 4. Se extrae la primera fracción insoluble usando los métodos de la presente invención, p.ej. como se describe en el Ejemplo 4. Se evalúan las proteínas IFN- α 2a y 2b presentes en la primera fracción insoluble y la segunda fracción soluble por CGE y se comparan.

Ejemplo 9. Análisis del producto de extracción de IFN- α 2a y 2b

Se analiza en el producto de extracción obtenido en el Ejemplo 8 la bioactividad de IFN- α 2a y 2b.

Lista de secuencias

20 <110> PFENEX INC.
 <120> MÉTODO PARA PRODUCIR PROTEÍNA DE INTERFERÓN RECOMBINANTE SOLUBLE SIN
 25 DESNATURALIZACIÓN
 <130> 38194-704.601
 <140>
 <141>
 30 <150> 61/310,671
 <151> 04-03-2010
 <160> 7
 35 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 166
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 45 <400> 1

ES 2 639 398 T3

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 2
- <211> 499
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 2

atgtcgtaca acctggtggg cttcctgcag cggtcctcca actttcaatc gcagaagctg 60

ctgtggcaat tgaatggtcg cctggaatac tgctgaagg accgcatgaa cttcgacatc 120

cctgaagaga ttaagcaact ccagcagttc cagaaagagg atgcagctct gacgatctat 180

gaaatgctgc agaacatctt cgcgatcttt cgccaggaca gcagcagcac cggttggaac 240

gaaaccattg tcgagaatct gctggccaac gtctatcacc agattaacca cctcaagact 300

gtgctggaag agaagttgga gaaagaagat ttcacgcgtg gcaagttgat gagttcgctg 360

catttgaaac gctactatgg tcgtatcctg cattacctga aggccaaaga atacagccac 420

tgtgcgtgga ccatogttcg cgtggagatc ctgcgcaact tctacttcat caatcggctc 480

15 accggttacc tccgcaact 499

<210> 3

ES 2 639 398 T3

<211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
 50 55 60

10 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

15 <210> 4
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 4

ES 2 639 398 T3

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
 165

5 <210> 5
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 5

tgtgacctgc ctcagactca ctcacctcgg agccgcgga cactgatgct gttggcgcag 60
 atgcgtaaga tctccctggt ctcgtgcctg aaagaccgcc atgatttcgg cttcccgcag 120
 gaagaattcg ggaaccagtt tcagaaggct gaaaccatcc cagtgcctgca cgagatgatc 180
 cagcaaattt tcaacctggt cagcaccaag gacagctcgg ccgcctggga cgaaacgttg 240
 ttggacaaat ttacaccga gctgtaccaa caactgaacg atctggaagc atgcgttatt 300
 caaggcgtgg gcgtcaccga aacgccgctg atgaaagaag atagcatcct ggccgtgcgt 360
 aagtactttc agcgcacac cctctacctg aaagagaaga agtattcggc ctgcgcgtgg 420
 gaggtcgtcc gcgccgagat catgcggtcc ttcagcctct ccaccaatct gcaggaaagt 480
 15 ctccgctoga aagaa 495

ES 2 639 398 T3

<210> 6
 <211> 165
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 10 <400> 6

 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

 Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 15
 <210> 7
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

 <400> 7
 25

ES 2 639 398 T3

tgtgacctgc ctcagactca ctcacctcggg agccgcgga ccctgatgct gttggcgcag	60
atgcgtcgca tctccctggt ctcgtgcctg aaagaccgcc atgatttcgg ctteccgcag	120
gaagaattcg ggaaccagtt tcagaaggct gaaaccatcc cagtgcctgca cgagatgatc	180
cagcaaattt tcaacctggt cagcaccaag gacagctcgg ccgcctggga cgaaacgttg	240
ttggacaaat tttacaccga gctgtaccaa caactgaacg atctggaagc atgcgttatt	300
caaggcgtgg gcgtcaccga aacgccgctg atgaaagaag atagcatcct ggccgtgcgt	360
aagtactttc agcgcacac cctctacctg aaagagaaga agtattcgcc ctgcgcgtgg	420
gaggtcgtcc gcgccgagat catgcggtcc ttcagcctct ccaccaatct gcaggaaagt	480
ctccgctcga aagaa	495

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína interferón de tipo 1 recombinante, comprendiendo dicho método:
 - expresar la proteína interferón recombinante cultivando una célula hospedadora de *Pseudomonas* o *E.coli* que contiene un constructo de expresión, comprendiendo dicho constructo de expresión un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína interferón de tipo 1 que se ha optimizado para expresión en la célula hospedadora;
 - lisar la célula hospedadora cultivada;
 - obtener una fracción insoluble y una fracción soluble a partir de la célula hospedadora lisada;
 - extraer la fracción insoluble sometiéndola a condiciones de extracción no desnaturizantes, en el que dichas condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden un detergente iónico dipolar o glucopiranosido de octilo y una concentración no desnaturizante de un agente caotrópico; y
 - obtener un sedimento de extracto y un sobrenadante de extracto a partir de la fracción insoluble extraída;
 - en el que la proteína recombinante en el sobrenadante de extracto está presente en forma soluble, forma activa o una combinación de las mismas, sin someterse además a una etapa de renaturalización o plegamiento.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de codificación de la proteína interferón de tipo I está ligada operativamente con un promotor derivado de lac, en el que el cultivo comprende:
 - hacer crecer la célula hospedadora a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 33 °C y a un pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5 hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 80 a aproximadamente 160; e
 - inducir la célula hospedadora con una concentración de IPTG de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el detergente iónico dipolar es Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-14 o CHAPS.
4. El método de la reivindicación 3, en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 % de Zwittergent 3-14.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la concentración no desnaturizante de un agente caotrópico es urea de 1 M a 2 M o hidrocloreuro de guanidinio de 1 M a 2 M.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden además una sal cosmotrópica; preferiblemente en el que el agente caotrópico es urea o hidrocloreuro de guanidinio, y preferiblemente en el que la sal cosmotrópica es NaCl, KCl, o (NH₄)₂SO₄.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden: de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 % de Zwittergent 3-14; urea de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 M; NaCl de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 M y en el que el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5;
 - preferiblemente en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden: aproximadamente 1 % de Zwittergent 3-14; urea aproximadamente 2 M; NaCl aproximadamente 2 M y en el que el pH es de aproximadamente 8,2.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden adicionalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40 % p/v de sólidos; preferiblemente en el que las condiciones de extracción no desnaturizantes comprenden adicionalmente aproximadamente 5 % p/v de sólidos.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β, un interferón α, un interferón κ o un interferón ω.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón β, y en el que dicho interferón β se selecciona del grupo consistente en: un interferón β 1b humano y un interferón β 1b C17S humano, o en el que la proteína interferón de tipo 1 recombinante es un interferón α y en el que el interferón α se selecciona del grupo consistente en: interferón α 2a humano e interferón α 2b humano;
 - preferiblemente en el que el interferón de tipo 1 es un interferón β 1b humano o un interferón β 1b C17S humano, y en el que el interferón β 1b humano o interferón β 1b C17S humano se expresa en el citoplasma de la célula

hospedadora.

- 5 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-10, que comprende además medir la cantidad de proteína interferón de tipo 1 recombinante en una muestra de la fracción insoluble, obtenida dicha muestra de la fracción insoluble antes de extraer la fracción insoluble, y medir la cantidad de proteína interferón de tipo 1 recombinante en una muestra del sobrenadante de extracto, obtenida dicha muestra de sobrenadante de extracto después de extraer la fracción insoluble, en el que la cantidad de proteína interferón recombinante detectada en la muestra del sobrenadante de extracto obtenida después de extraer la fracción insoluble es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 95 % de la cantidad de proteína interferón recombinante medida en la muestra de fracción insoluble obtenida antes de extraer la fracción insoluble.
- 10 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11, que comprende además medir la actividad de la proteína interferón recombinante en una muestra del sobrenadante de extracto, obtenida dicha muestra del sobrenadante de extracto después de extraer la fracción insoluble, en el que se determina que de aproximadamente 40 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante presente en la muestra de sobrenadante de extracto obtenida después de extraer la fracción insoluble es activa, o en el que se determina que de aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 % de la proteína interferón recombinante presente en la muestra del sobrenadante de extracto obtenida después de extraer la fracción insoluble es activa en comparación con la cantidad de proteína interferón activa en una muestra patrón que contiene la misma cantidad de proteína interferón recombinante que la muestra de sobrenadante de extracto obtenida después de extraer la fracción insoluble.
- 15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la proteína recombinante es un interferón β , y en el que la cantidad de proteína recombinante activa se determina por cromatografía en columna de afinidad Blue Sepharose, ensayo de unión a receptor, ensayo de actividad antivírica o ensayo de efecto citopático.
- 20 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la proteína interferón de tipo 1 recombinante en el sobrenadante de extracto está presente a una concentración de aproximadamente 0,3 gramos por litro a aproximadamente 10 gramos por litro.
- 25 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la célula hospedadora es una estirpe de delección de proteasa lon hslUV.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el interferón de tipo 1 se expresa en el citoplasma de la célula hospedadora.

FIGURA 1

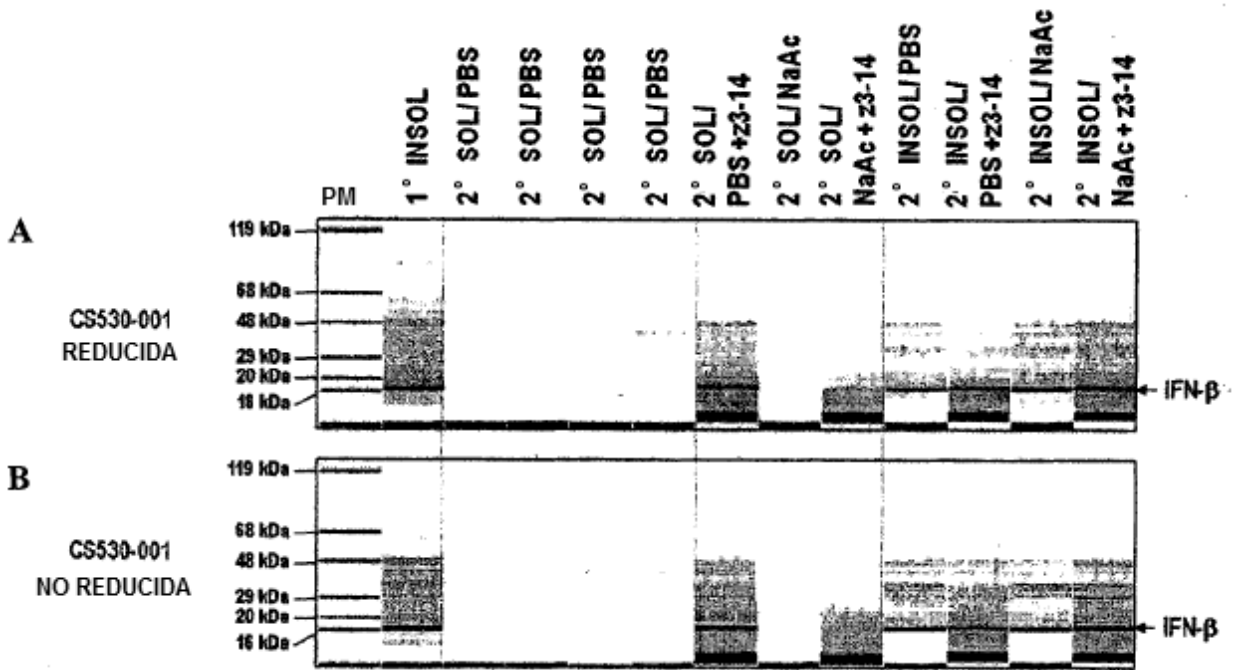


FIGURA 2

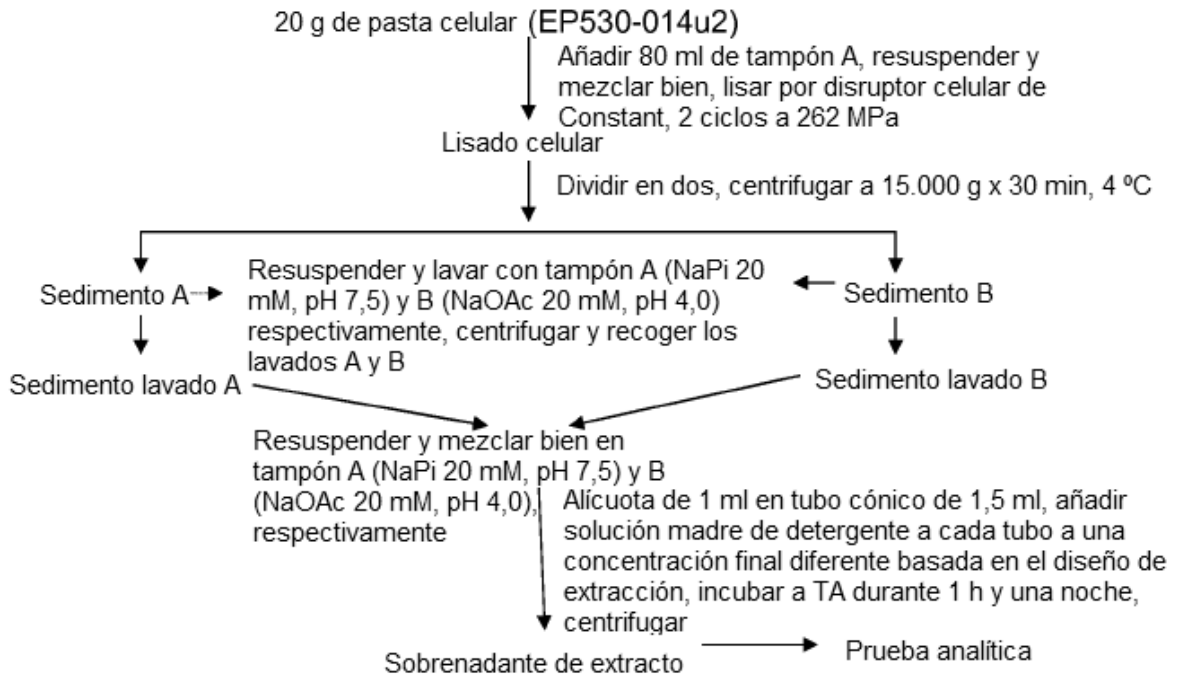


FIGURA 3

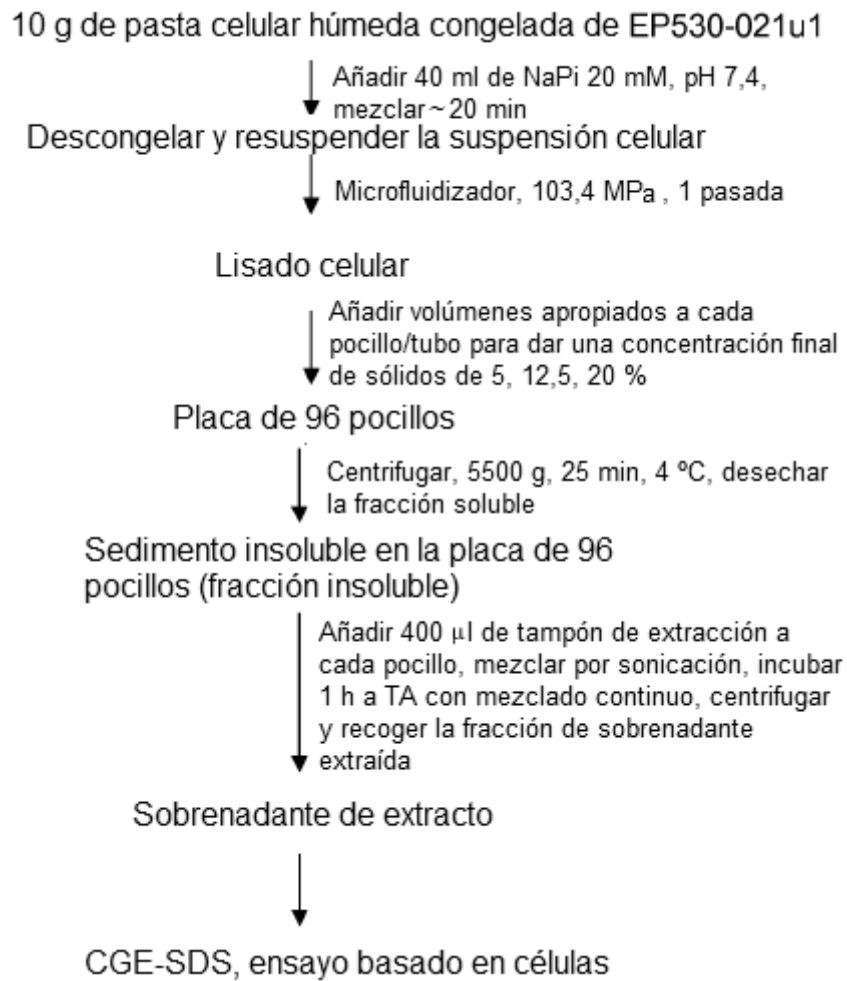
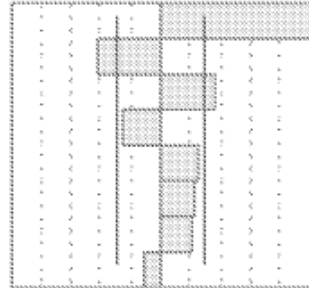


FIGURA 4

A

Término	Estimación	Error est.	Rel. de t	Prob> t
Z314	3720,4167	489,4339	7,60	< 0,0001*
Sólidos	-92,575	29,36603	-3,15	0,0103*
Urea	615,9375	220,2452	2,80	0,0189*
(Sólidos-12,5)*(Z314-0,55)	-127,5	65,25785	-1,95	0,0792
NaCl	500,51471	259,112	1,93	0,0822
(NaCl-1)*(Z314-0,55)	1008,3333	575,8046	1,75	0,1105
pH	353,1875	220,2452	1,60	0,1399
(Sólidos-12,5)*(NaCl-1)	-30,7549	34,54827	-0,89	0,3943



B

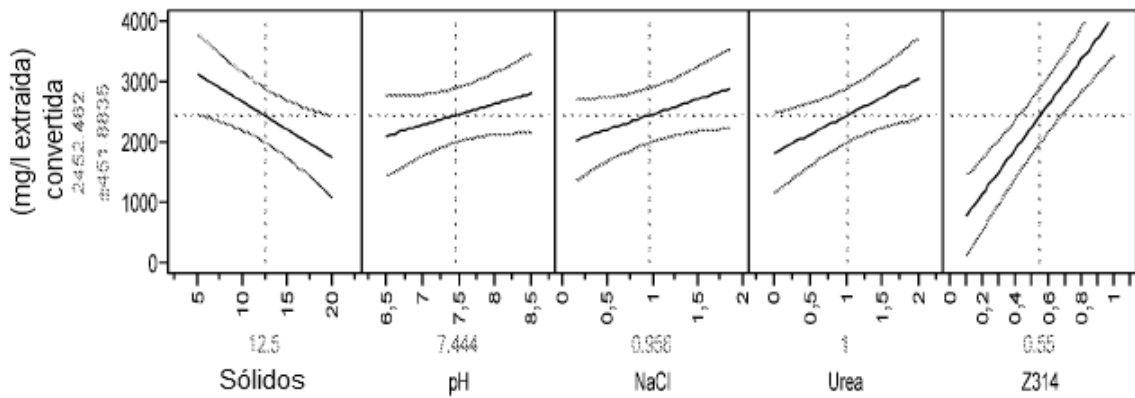


FIGURA 5

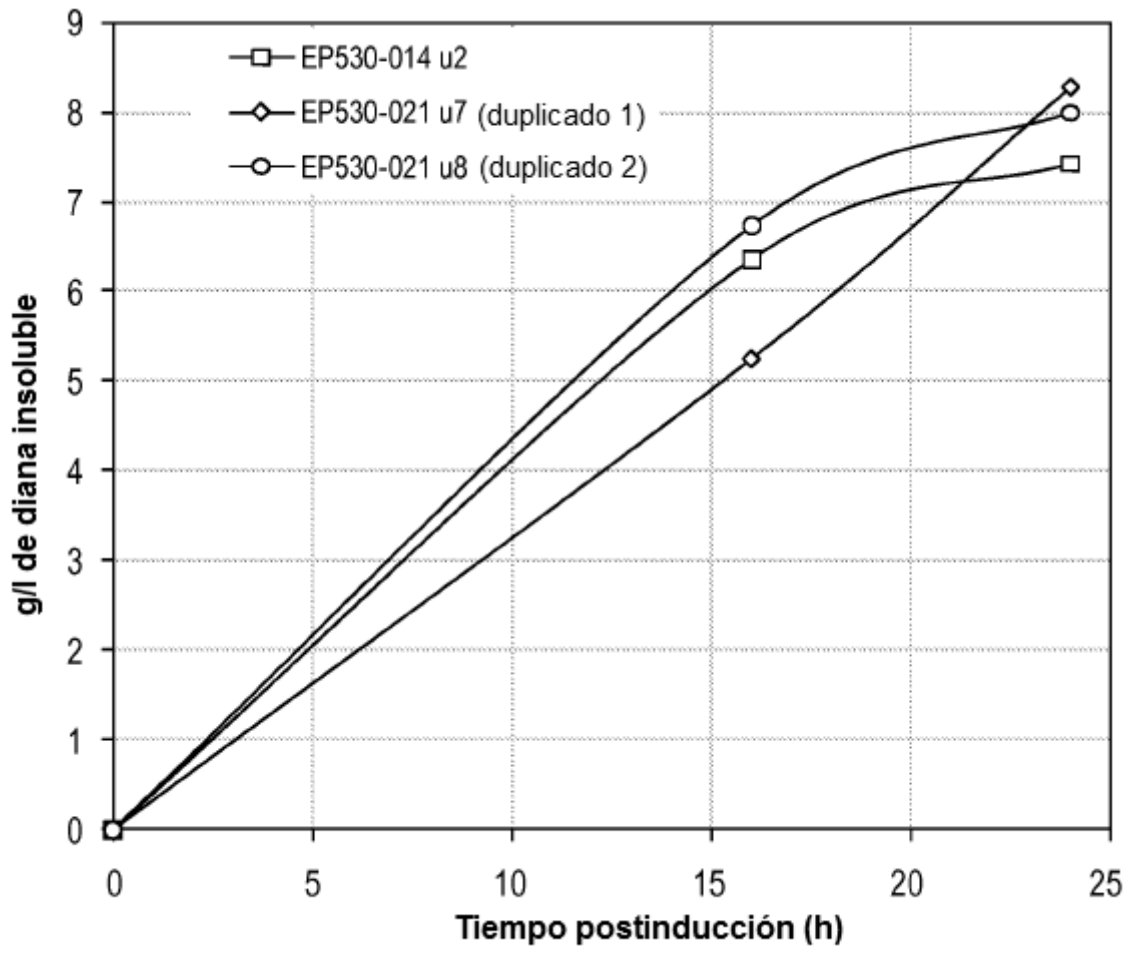


FIGURA 6

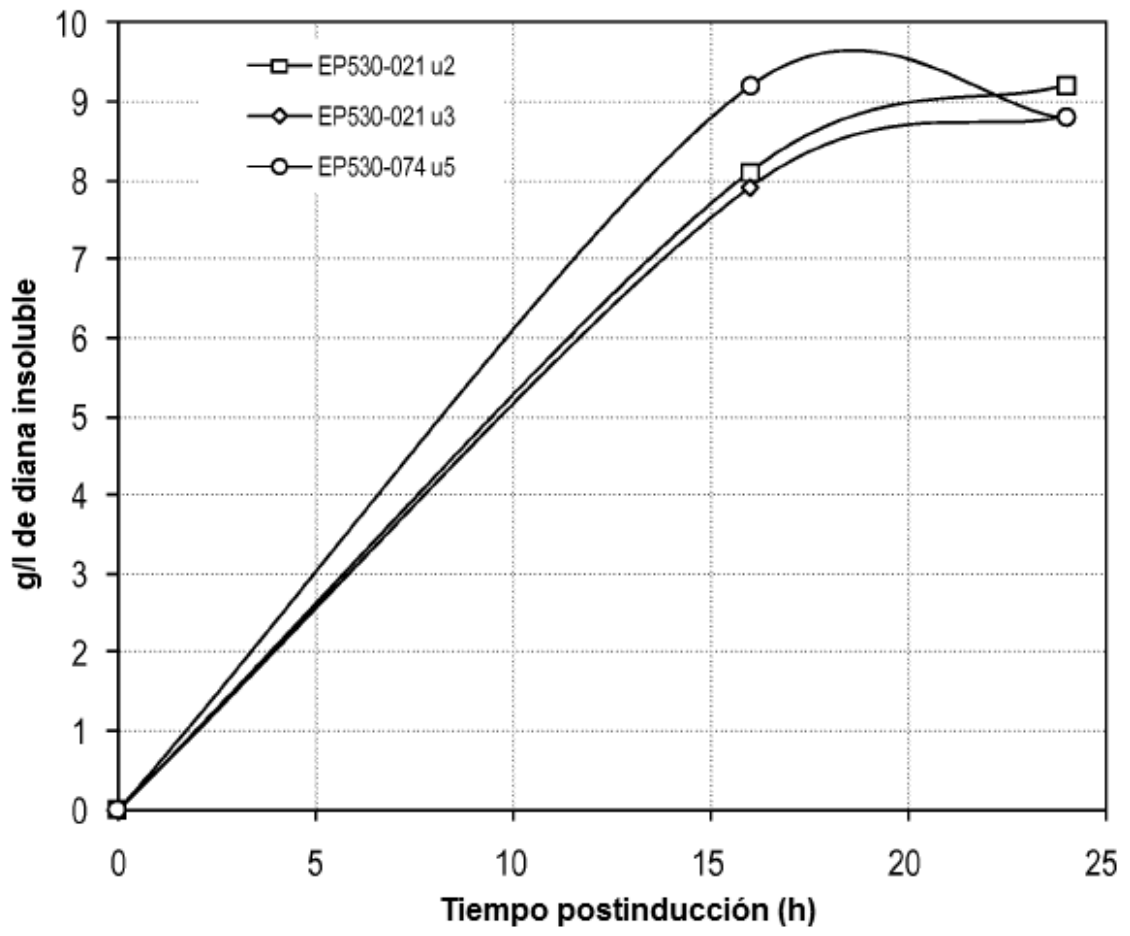


FIGURA 7

A

MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQF
QKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTV
LEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILR
NFYFINRLTGYL RN (SEQ ID NO: 1)

B

Atgtcgtacaacctgtgggcttctgcagcggctccaacttcaatcgcagaagctgctgtggcaattgaatggc
cctggaatactgctgaaggaccgcatgaactcgacatccctgaagagattaagcaactccagcagtcagaaaga
ggatgcagctctgacgatctatgaaatgctgcagaacatcttcgcatcttcgccaggacagcagcagcaccggtg
gaacgaaaccattgtcgagaatctgctggccaacgtctatcaccagattaaccacctcaagactgtgctggaagagaa
gttgagaaaagaagattcacgcgtggcaagttgatgagttcgtgcattgaaacgctactatggctgtatcctgcatta
cctgaaggccaaagaatacagccactgtgcgtggaccatcgttcgctggagatcctgcgcaacttacttcatcaat
cggctcaccggttacctccgcaact (SEQ ID NO: 2)

C

SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQ
KEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVL
EEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILR
NFYFINRLTGYL RN (SEQ ID NO: 3)

FIGURA 8

A

1 C D L P Q T H S L G S R R T L M L L A Q
 21 M R K I S L F S C L K D R H D F G F P Q
 41 E E F G N Q F Q K A E T I P V L H E M I
 61 Q Q I F N L F S T K D S S A A W D E T L
 81 L D K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I
 101 Q G V G V T E T P L M K E D S I L A V R
 121 K Y F Q R I T L Y L K E K K Y S P C A W
 141 E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E S
 161 L R S K E (SEQ ID NO: 4)

B

1 TGTGACCTGCCTCAGACTCACTCCCTCGGTAGCCGCCGGACCCTGATGCTGTTGGCGCAG
 61 ATGCGTAAGATCTCCCTGTTCTCGTGCCTGAAAGACCGCCATGATTTTCGGCTTCCCGCAG
 121 GAAGAATTCGGGAACCAGTTTCAGAAGGCTGAAACCATCCCAGTGCTGCACGAGATGATC
 181 CAGCAAATTTTCAACCTGTTTCAGCACCAAGGACAGCTCGGCCGCCTGGGACGAAACGTTG
 241 TTGGACAAATTTTACACCGAGCTGTACCAACAACCTGAACGATCTGGAAGCATGCGTTATT
 301 CAAGGCGTGGGCGTCACCGAAACGCCGCTGATGAAAGAAGATAGCATCCTGGCCGTGCGT
 361
 AAGTACTTTCAGCGCATCACCCCTCTACCTGAAAGAGAAGAAGTATTCGCCCTGCGCGTGG
 421
 GAGGTCGTCCGCGCCGAGATCATGCGGTCCTTCAGCCTCTCCACCAATCTGCAGGAAAGT
 481 CTCCGCTCGAAAGAA (SEQ ID NO: 5)

FIGURA 9

A

1 C D L P Q T H S L G S R R T L M L L A Q
 21 M R R I S L F S C L K D R H D F G F P
 Q
 41 E E F G N Q F Q K A E T I P V L H E M
 I
 61 Q Q I F N L F S T K D S S A A W D E T
 L
 81 L D K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V
 I
 101 Q G V G V T E T P L M K E D S I L A V
 R
 121 K Y F Q R I T L Y L K E K K Y S P C A
 W
 141 E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E
 S
 161 L R S K E (SEQ ID NO: 6)

B

1 TGTGACCTGCCTCAGACTCACTCCCTCGGTAGCCGCCGGACCCTGATGCTGTTGGCGCAG
 61 ATGCGTCGCATCTCCCTGTTCTCGTGCCTGAAAGACC GCCATGATTTCCGGCTTCCCGCAG
 121 GAAGAATTCGGGAACCAGTTTCAGAAGGCTGAAACCATCCCAGTGCTGCACGAGATGATC
 181 CAGCAAATTTTCAACCTGTTTCAGCACCAAGGACAGCTCGGCCGCCTGGGACGAAACGTTG
 241 TTGGACAAATTTTACACCGAGCTGTACCAACAAC TGAACGATCTGGAAGCATGCGTTATT
 301 CAAGGCGTGGGCGTCACCGAAACGCCGCTGATGAAAGAAGATAGCATCCTGGCCGTGCGT
 361 AAGTACTTTTCAGCGCATCACCCCTCTACCTGAAAGAGAAGAAGTATTCGCCCTGCGCGTGG
 421 GAGGTCGTCCGCGCCGAGATCATGCGGTCCTTCAGCCTCTCCACCAATCTGCAGGAAAGT
 481 CTCCGCTCGAAAGAA (SEQ ID NO: 7)