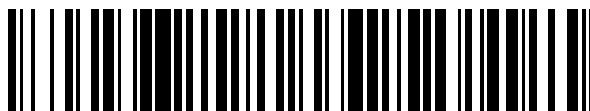


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 374**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2013 PCT/EP2013/055529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2013 E 13709469 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2828396**

54 Título: **Método para la producción de G-CSF**

30 Prioridad:

19.03.2012 HU P1200171

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

22.11.2019

73 Titular/es:

RICHTER GEDEON NYRT. (100.0%)

Gyömrői út 19-21

1103 Budapest, HU

72 Inventor/es:

FELFÖLDI, FERENC;

OLASZ, KATALIN y

KOZMA, JÓZSEF

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 732 374 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 la producción de G-CSF

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere al campo de producción de polipéptidos, en particular a la producción de polipéptidos recombinantes en células huésped que producen el polipéptido recombinante en cuerpos de inclusión.

10 **Antecedentes**

La expresión de polipéptidos recombinantes en células huésped es una tecnología convencional ampliamente usada en biotecnología y la industria farmacéutica. Especialmente, se usan con frecuencia huéspedes microbianos como, por ejemplo, *E. coli*, puesto que están disponibles condiciones de cultivo celular y sistemas de expresión relativamente simples para estas células huésped. En general el proceso de cultivo es, por tanto, comparativamente económico.

20 Sin embargo, a menudo es difícil obtener un polipéptido de interés en forma soluble y activa cuando se expresa en células microbianas. A menudo, la expresión de un polipéptido recombinante conduce a la producción de agregados intracelulares poco solubles del polipéptido en forma desnaturalizada, los denominados cuerpos de inclusión [Baneyx, F. y Mujacic, M. (2004) Nat. Biotechnol. 22, 1399-1408 y Sorensen, H.P. y Mortensen, K.K. (2005) Microb. Cell Fact. 4, 1], también denominados cuerpos de inclusión clásicos.

25 Los cuerpos de inclusión clásicos son generalmente fáciles de aislar, normalmente mediante centrifugación a velocidad moderada. Para recuperar el polipéptido activo, es decir plegado correctamente, de los cuerpos de inclusión, los cuerpos de inclusión han de solubilizarse y la proteína renaturalizarse tras el aislamiento. Varias solicitudes de patente y patentes tratan con el aspecto de solubilizar los cuerpos de inclusión y renaturalizar las proteínas obtenidas de cuerpos de inclusión. Por ejemplo, los documentos EP0512097, EP0364926, EP0219874, WO01/87925, Rudolph 1996, Rudolph 1990, Marston 1986 y Dietrich 2003 describen técnicas generales relacionadas con la solubilización y renaturalización de proteínas desnaturalizadas. Por ejemplo, el documento EP0219874 divulga métodos genéricos para el replegamiento de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Para la solubilización, se usaron los agentes caotrópicos GuHCl y arginina a pH elevado. El documento EP0219874 describe la formación de puentes disulfuro en condiciones rédox proporcionadas por GSH/GSSG.

35 El documento CN.101691560.A se refiere a un colibacilo y a un método de realización de expresión soluble de proenzima transglutaminasa del mismo.

Peternel *et al.*, Microbial Cell Factories 2008, vol. 7 n.º 1 se refiere a la modificación por ingeniería genética de cuerpos de inclusión para la extracción no desnaturalizante de proteínas funcionales.

40 A pesar del hecho de que se conocen numerosos procedimientos para el aislamiento y la solubilización de cuerpos de inclusión, los resultados no son siempre satisfactorios. Un problema principal es que la estructura de los cuerpos de inclusión puede variar. Se sabe que la formación y la estructura de los cuerpos de inclusión pueden estar influidas por parámetros del procedimiento de cultivo celular, incluyendo por ejemplo composición del medio, temperatura de crecimiento y tasa de producción. El documento WO2004/015124 describe la formación de cuerpos de inclusión "no clásicos" mediante la modulación de las condiciones de cultivo.

50 La obtención de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión, en particular en forma activa y cantidades suficientes, puede ser problemática. A veces la estructura de los cuerpos de inclusión es demasiado "blanda" lo que conduce a la situación de que el aislamiento de los cuerpos de inclusión mediante centrifugación es difícil. Por otro lado, es posible que los cuerpos de inclusión sean demasiado compactos. Esto da como resultado cuerpos de inclusión que no pueden solubilizarse incluso en condiciones rigurosas.

55 Para superar estas desventajas, la presente invención proporciona nuevos procedimientos de cultivo celular tal como se reivindica que conducen a grandes cantidades de proteína plegada adecuadamente en cuerpos de inclusión que pueden aislarse y solubilizarse fácilmente, dando como resultado un rendimiento aumentado de la proteína G-CSF recombinante.

60 **Sumario de invención**

La invención proporciona:

[1] Un método para la producción de un polipéptido de G-CSF recombinante en cuerpos de inclusión, comprendiendo el método

65 (a) cultivar una célula huésped bacteriana a una primera temperatura entre 36°C y 38°C, comprendiendo la célula

huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante,

(b) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura entre 30°C y 35°C, y

(c) cultivar la célula huésped bacteriana a la segunda temperatura,

en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor T7 inducible y en el que la reducción de la temperatura se realiza cuando el cultivo celular ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de entre 10 y 50, y en el que el cromosoma de la célula huésped bacteriana comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una ARN polimerasa de bacteriófago unida operativamente a un promotor lac.

[2] El método según [1], en el que el huésped bacteriano es *E. coli*.

[3] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la primera temperatura es de 37°C.

[4] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la segunda temperatura está entre 31°C y 33°C.

[5] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el pH durante el cultivo a la primera temperatura y/o la segunda temperatura está entre 6 y 8.

[6] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el pH durante el cultivo a la primera temperatura y/o la segunda temperatura está entre 6,8 y 7,2.

[7] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la reducción de la temperatura se realiza cuando el cultivo celular ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de entre 27 y 33.

[8] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el G-CSF es G-CSF humano o bovino, opcionalmente con un residuo de aminoácido de metionina inicial en la posición -1, respectivamente.

[9] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, estando precedidas las etapas (a) a (c) por una etapa de introducción en una célula huésped bacteriana de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante, en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor inducible.

[10] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el cromosoma de la célula huésped bacteriana comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para ARN polimerasa de bacteriófago, unida operativamente a un promotor lac, y está libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno, en el que opcionalmente la ARN polimerasa de bacteriófago es T7 polimerasa.

[11] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la expresión del polipéptido de G-CSF se realiza mediante la adición de un inductor, en el que opcionalmente el inductor se añade simultáneamente con o posteriormente a la reducción de la temperatura, en el que opcionalmente el inductor es IPTG.

[12] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el vector comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.

[13] El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante se selecciona del grupo que consiste en

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 1; y

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia tal como se representa en SEQ ID NO: 3.

La presente divulgación se refiere al campo de producción de polipéptidos, en particular a la producción de polipéptidos recombinantes en células huésped que producen el polipéptido recombinante en cuerpos de inclusión. La presente divulgación proporciona un nuevo método para la producción de polipéptidos recombinantes a partir de cuerpos de inclusión lo que da como resultado rendimientos mejorados de proteína activa. Los presentes inventores demuestran en el presente documento que la modulación de las condiciones de cultivo celular afecta positivamente al rendimiento del polipéptido recombinante en forma activa. Por ejemplo, los inventores han encontrado que un método de cultivo de dos etapas que implica una primera temperatura de cultivo superior y una segunda temperatura de cultivo inferior es beneficioso. En el presente documento se describen otros parámetros de cultivo que también afectan positivamente al crecimiento celular y la expresión de polipéptido recombinante en células microbianas huésped.

En un aspecto, la invención proporciona un método tal como se reivindica para la producción de un polipéptido de G-CSF recombinante en cuerpos de inclusión, comprendiendo el método

- 5 (a) cultivar una célula huésped bacteriana a una primera temperatura, comprendiendo la célula huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante,
- (b) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura, y
- 10 (c) cultivar la célula huésped bacteriana a la segunda temperatura.

La célula huésped bacteriana puede ser una célula de *E. coli*. La primera temperatura está entre 36°C y 38°C, preferiblemente 37°C. La segunda temperatura está entre 30°C y 35°C, y más preferiblemente entre 32°C y 35°C. El pH durante el cultivo a la primera temperatura y/o la segunda temperatura puede estar entre 6 y 8, preferiblemente entre 6,8 y 7,2.

La reducción de la temperatura se realiza cuando el cultivo celular ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de entre 10 y 50, más preferiblemente entre 27 y 33.

- 20 El polipéptido recombinante es G-CSF. En algunas realizaciones, el G-CSF es G-CSF humano o bovino, opcionalmente con un residuo de aminoácido de metionina inicial en la posición -1, respectivamente.

El ácido nucleico se une operativamente a un promotor inducible. El ácido nucleico puede estar comprendido en un vector, tal como un vector de expresión. En algunas realizaciones, las etapas (a) a (c) están precedidas por una etapa de introducción en una célula huésped de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante, en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor inducible.

El promotor inducible es un promotor T7. El cromosoma de la célula huésped microbiana comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para ARN polimerasa de bacteriófago, unida operativamente a un promotor lac, y puede estar libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno. La ARN polimerasa de bacteriófago puede ser T7 polimerasa.

En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido de G-CSF recombinante se realiza mediante la adición de un inductor. El inductor puede añadirse simultáneamente con o posteriormente a la reducción de la temperatura. El inductor puede ser IPTG.

En realizaciones preferidas, el vector comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.

40 En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 1, o (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia tal como se representa en SEQ ID NO: 3.

45 **Breve descripción de las figuras y tablas**

Tabla 1: Rendimiento de G-CSF de cultivo celular con segundas temperaturas de cultivo variadas

Tabla 2: Lista de condiciones preferidas para el procesamiento posterior que incluye dos etapas de repliegamiento.

50 Tabla 3: Pureza y rendimientos de tres series de producción empezando con 650 g de cuerpos de inclusión lavados y congelados. El cálculo de los rendimientos se refiere a la masa húmeda de los cuerpos de inclusión.

Tabla 4: Valores de pureza total y de dos impurezas seleccionadas relacionadas con el proceso (sarcosilo, endotoxinas) durante la purificación de G-CSF. Los intervalos indican los resultados del análisis de tres lotes de producción de G-CSF usando diferentes métodos analíticos.

Tabla 5: Pureza y actividad de tres lotes de producción de G-CSF.

60 Figura 1: A, Dibujo esquemático del vector de expresión del ejemplo 1; B, Secuencia del vector de expresión de G-CSF, SEQ ID NO: 4.

Figura 2: Cromatogramas de SEC-HPLC que analizan la pureza de un producto farmacológico de filgrastim disponible comercialmente como referencia (3A) y el producto purificado tal como se describe en el presente documento.

Descripción

La presente divulgación proporciona un método para la producción de polipéptidos recombinantes, que se expresan en cuerpos de inclusión en una célula huésped. Se introduce un ácido nucleico que codifica para el polipéptido recombinante en una célula huésped. La célula huésped se cultiva entonces para expresar el polipéptido recombinante, en la que la célula huésped forma cuerpos de inclusión que contienen la proteína recombinante. Tras un primer periodo de cultivo y durante el cultivo continuo, la temperatura de cultivo se cambia desde una temperatura superior hasta una inferior. El cultivo de la célula huésped se continúa entonces a la temperatura inferior.

Los presentes inventores demuestran en el presente documento que la modulación de las condiciones de cultivo celular afecta positivamente al rendimiento del polipéptido recombinante en forma activa. Los inventores han encontrado sorprendentemente que reducir la temperatura del cultivo celular durante el cultivo de la célula huésped conduce a un rendimiento aumentado de la proteína recombinante. Los inventores también han encontrado que otros parámetros, tales como el modo de inducción, el pH, el procesamiento posterior, y en particular la elección de sistema de expresión, etc., también pueden ejercer un efecto positivo sobre el rendimiento. Se encontró que una combinación de temperaturas preferidas y sistemas de expresión preferidos tal como se describe en el presente documento era particularmente beneficiosa.

Sin limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que la modulación de la temperatura de cultivo tal como se describe en el presente documento optimiza la estructura de los cuerpos de inclusión, lo que aumenta la cantidad de proteína plegada correctamente en los cuerpos de inclusión y, por tanto, facilita la recuperación de más proteína recombinante activa de los cuerpos de inclusión. Los inventores creen que la estructura y la composición de los cuerpos de inclusión pueden ser un factor limitante con respecto al rendimiento del polipéptido activo renaturalizado. Los parámetros adicionales descritos en el presente documento, tal como el modo de inducción, el pH, el procesamiento posterior, y en particular el sistema de expresión, facilitan además aumentos adicionales en el rendimiento. Los diversos parámetros adicionales descritos en el presente documento pueden aplicarse individualmente o pueden combinarse aplicando uno o más de los parámetros a los métodos descritos en el presente documento. Los métodos descritos en el presente documento dan como resultado crecimiento celular mejorado y expresión de polipéptido recombinante mejorada en células microbianas huésped.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método tal como se reivindica para la producción de un polipéptido de G-CSF recombinante expresado en cuerpos de inclusión, comprendiendo el método las etapas de (a) cultivar un cultivo celular de células microbianas huésped a una primera temperatura, comprendiendo las células huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante, (b) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura, y (c) cultivar el cultivo de células microbianas huésped a la segunda temperatura. La reducción de la temperatura se realiza durante el cultivo continuo. El ácido nucleico se ha introducido en las células huésped. El ácido nucleico puede estar comprendido en un vector. El ácido nucleico puede unirse a un promotor inducible.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para designar una serie de residuos de aminoácido conectados entre sí mediante enlaces peptídicos.

Un "ácido nucleico recombinante" es un ácido nucleico que resulta del uso de técnicas de ingeniería molecular para crear nuevas combinaciones de material genético, generando ácidos nucleicos que de otro modo no se encuentran en los organismos biológicos. Las proteínas que resultan de la expresión de ácido nucleico recombinante dentro de células vivas se denominan "proteínas recombinantes" o "polipéptidos recombinantes". El ácido nucleico recombinante, que codifica para la proteína G-CSF recombinante, se introduce en una célula huésped. El "ácido nucleico" tal como se usa en los métodos en el presente documento puede ser un ácido nucleico heterólogo, es decir un ácido nucleico que es foráneo a la célula huésped. O, el ácido nucleico puede derivar del huésped y puede codificar para un polipéptido que expresa de manera natural dicho huésped. Por ejemplo, introducir una segunda copia puede conducir a expresión aumentada. O, la secuencia de ácido nucleico se pone bajo un control de la transcripción distinto del control de la transcripción encontrado normalmente para este ácido nucleico en el huésped. La proteína en su forma recombinante se expresaría, por tanto, a un nivel de expresión diferente, por ejemplo puede sobreexpresarse o subexpresarse en comparación con su nivel de expresión endógeno.

La secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica para la proteína G-CSF puede modificarse antes de que se introduzca en una célula huésped, mediante una o más mutaciones, inserciones, deleciones y/o sustituciones, siempre que tal secuencia modificada codifique para una proteína activa, que tiene la misma función biológica que dicha proteína G-CSF (es decir, es un equivalente funcional de la proteína de interés). Una secuencia de ácido nucleico recombinante tal como se hace referencia en el presente documento también abarca secuencias de ácido nucleico que se originan de un dominio diferente (imperio) de organismos, tales como de eucariotas (de origen eucariota), tal como por ejemplo secuencias humanas, que se han modificado según el "uso de codón" de un huésped procariota con el fin de optimizar la expresión en la célula huésped.

La presente divulgación puede aplicarse a cualquier proteína que se produce en cuerpos de inclusión. Los cuerpos

de inclusión los forman generalmente proteínas relativamente hidrófobas (tales como G-CSF), por tanto la presente divulgación puede aplicarse fácilmente a proteínas relativamente hidrófobas, especialmente aquellas que (similares a G-CSF) no tienen demasiados enlaces disulfuro. La presente divulgación puede ser, por tanto, particularmente adecuada para proteínas que tienen propiedades similares que G-CSF, tales como solubilidad similar, hidrofobicidad similar, número similar de enlaces cisteína, etc. Los métodos de la divulgación pueden aplicarse a proteínas hidrófobas.

En particular, los inventores han encontrado que las denominadas "proteínas de haz de hélice", y especialmente las "proteínas de haz de cuatro hélices" muestran tasas de expresión altas mejoradas particulares con los métodos descritos en el presente documento. Todas las proteínas de haz de hélice tienen una estructura de núcleo en común. Presentan varias hélices alfa en su estructura secundaria, que están orientadas habitualmente en formación paralela o antiparalela entre sí en la estructura terciaria. Las proteínas de haz de cuatro hélices son particularmente adecuadas para producirse con los métodos según la presente divulgación. Ricci *et al*, 2003 y Weber *et al*, 1980 describen estructuras comunes y miembros de la familia de proteínas de haz de cuatro hélices. Los ejemplos no limitativos de proteínas de haz de hélice, que son particularmente adecuados para la presente divulgación, incluyen G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos), M-CSF (factor estimulante de macrófagos), hGH (hormona de crecimiento humana), interferones, tales como IFN-alfa 2 (interferón alfa 2) o interferón beta, interleucinas, tales como IL-2 (interleucina-2), IL-4 (interleucina-4), IL-7 (interleucina-7) o IL-9 (interleucina-9), eritropoyetina, leptina, MGDF (factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos), y otras citocinas. Preferiblemente, el polipéptido recombinante de la divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en G-CSF, GM-CSF, M-CSF, hGH, IFN-alfa 2, IL-2, IL-4, IL-7 e IL-9. Más preferiblemente, el polipéptido recombinante de la divulgación puede seleccionarse del grupo de G-CSF, GM-CSF y M-CSF.

La secuencia del ácido nucleico que codifica para la proteína recombinante puede optimizarse con codones para la expresión en una célula huésped microbiana, en particular *E. coli*.

El polipéptido recombinante de la invención es G-CSF. El factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hGCSF) pertenece a factores de crecimiento hematopoyéticos que tienen un papel decisivo en la formación de neutrófilos. Se usa G-CSF en medicina en el campo de hematología y oncología. En la actualidad, en el mercado hay dos formas de G-CSF para uso clínico: lenograstim, que está glicosilado y se produce en células de mamífero, específicamente una línea de células CHO (Holloway CJ (1994) Eur J Cancer 30A supl 3:S2-S6., documento EP 169566), y filgrastim, que no está glicosilado y se produce en *E. coli* (documento EP 237545).

"G-CSF" tal como se usa en el presente documento en el contexto de la invención incluye especies ortólogas de G-CSF, tales como por ejemplo G-CSF humano, G-CSF bovino, etc. La secuencia de aminoácidos de G-CSF humano es (SEQ ID NO: 1):

```
TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWA
PLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPPTLDLQLDVAADFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHQAQP
```

que, por ejemplo, puede encontrarse en Holloway, 1994, o con el número de registro de Drugbank DB00099.

La secuencia de aminoácidos de G-CSF bovino es (SEQ ID NO: 2):

```
TPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHEPEELMLLRHSLGIPQAP
LSSCSSQSLQLRGCLNQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQG AMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHRFLELAYRGLRYLAEP
```

que puede, por ejemplo, encontrarse en la figura 7 del documento US US5849883, o n.º de registro de PDB: 1BGC-A.

En algunas realizaciones preferidas el G-CSF es G-CSF de mamífero. En realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido es G-CSF humano [n.º de registro de Drugbank: DB00099], G-CSF bovino, [n.º de registro de PDB: 1BGC-A], o una variante funcional de los mismos. En algunas realizaciones preferidas, el polipéptido recombinante es metionil-G-CSF (Met-G-CSF), tal como Met-G-CSF humano (r-met-hu-G-CSF = filgrastim).

La secuencia de aminoácidos de filgrastim es (SEQ ID NO: 3):

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPPEELVLLGHSLGIPWA
 PLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDQVADDFATTIWQ
 QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHQAQP

También puede proporcionarse G-CSF bovino como metionil-G-CSF bovino.

5 "G-CSF" tal como se usa en el presente documento en el contexto de la invención incluye variantes funcionales de G-CSF. La referencia a "variante" en el presente documento significa referencia a "variante funcional", a no ser que el contexto indique lo contrario. Una variante de proteína G-CSF se refiere a una proteína que difiere de la secuencia de proteína G-CSF, pero tiene aún la misma actividad biológica (variante funcional). Una "variante" de proteína G-CSF se refiere a una proteína que difiere de la secuencia de proteína G-CSF de referencia (tal como la secuencia de G-CSF humano) en uno o más aminoácidos. Una "variante" puede, alternativamente o además, tener otras modificaciones tales como, por ejemplo, metilación, pegilación, succinilación, adición de etiquetas o marcadores, etc. La variante puede ser un G-CSF modificado enzimáticamente o químicamente. Puede ser una proteína de fusión fusionada con otro péptido o polipéptido. En realizaciones preferidas, el G-CSF está pegilado.

15 Las variantes pueden ser variantes naturales (véase, por ejemplo, Zsebo 1986), que incluyen variantes alélicas, o variantes generadas sintéticamente. Se demostró en la técnica anterior que se expresan formas modificadas de G-CSF en cuerpos de inclusión. Por tanto, pueden obtenerse variantes usando los métodos mejorados descritos en el presente documento. Por ejemplo, el documento EP0719860 describe en los ejemplos 2 y 3 la construcción y producción de G-CSF bovino modificado.

20 En algunas realizaciones, la variante de G-CSF es una proteína que comparte al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. (*r*-met-hu-G-CSF = filgrastim). La identidad de secuencia puede determinarse usando herramientas de análisis de secuencia convencionales, tales como por ejemplo Clustal, BLAST, etc. o algoritmos de alineación tales como por ejemplo, el algoritmo de Needleman-Wunsch, algoritmo de Smith-Waterman, etc. La variante puede tener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una sustitución de aminoácido es conservadora, si se intercambia un aminoácido con un aminoácido que tiene propiedades similares, por ejemplo un aminoácido polar con otro aminoácido polar, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, etc. Es menos probable que las sustituciones conservadoras afecten a las propiedades químicas y, por tanto, a la función de la proteína. Las "variantes" de G-CSF incluyen, por tanto, proteínas que tienen una o más mutaciones, deleciones, sustituciones, inserciones y/o modificaciones de uno o más aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 3, siempre que la variante de G-CSF todavía presente la misma función biológica que G-CSF (funcionalmente equivalente). Puede someterse a prueba si una variante tiene la misma función biológica en ensayos que determinan la actividad biológica de G-CSF (véanse, por ejemplo, los métodos indicados en el ejemplo 13). Puede usarse G-CSF comercialmente disponible como control de referencia. Puede considerarse que una variante tiene la "misma actividad biológica", es decir que es "biológicamente activa" o "activa" si tiene al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5% de la actividad de una referencia de G-CSF comercialmente disponible, tal como filgrastim.

La referencia a "G-CSF" en el presente documento incluye, por tanto, la referencia a especies ortólogas y variantes, es decir variantes funcionales, de G-CSF humano.

45 Los parámetros que pueden modularse durante el cultivo celular según la presente invención incluyen temperatura, pH, densidad óptica, nivel de oxígeno disuelto (DO), tasa de alimentación, fuente de carbono, y otros parámetros que afectan positivamente al rendimiento de la proteína recombinante activa.

Temperatura

50 En la invención, la temperatura de incubación del cultivo celular se reduce desde una primera temperatura superior hasta una segunda temperatura superior. La reducción de la temperatura se realiza durante el cultivo continuo de las células huésped. A la temperatura inferior, las células cambian desde la fase de crecimiento hasta la fase de producción. La primera temperatura está entre 36°C y 38°C. En realizaciones preferidas, la primera temperatura está entre 36,5°C y 37,5°C, o entre 36,7°C y 37,2°C, en realizaciones más preferidas la primera temperatura es de aproximadamente 37°C, en realizaciones más preferidas la primera temperatura es de 37°C.

60 Tal como se usa en el presente documento, si se hace referencia a un intervalo de valores en el presente documento tal como "entre x e y", entonces los valores específicos x e y se incluyen en el intervalo, a menos que se especifique expresamente lo contrario.

El cultivo celular de células huésped se incubaba a la primera temperatura durante la duración de un primer periodo de

cultivo. El primer periodo de cultivo puede estar entre 6 y 48 horas, pero puede ser más corto o más largo según el cultivo celular real. En realizaciones preferidas, el primer periodo de cultivo puede ser de 5 a 40 horas, o de 10 a 36 horas, o de 10 a 32 horas, o de 14 a 28 horas, o de 18 a 24 horas. En particular, el primer periodo de cultivo puede ser de 10, 12, 12,5, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, o puede ser un periodo definido por cualquier combinación de dos de estos valores. La duración del primer periodo de cultivo se determina basándose en la densidad óptica del cultivo celular (véase a continuación).

Después del primer periodo de cultivo, la temperatura se reduce, por ejemplo simplemente restableciendo la temperatura del fermentador hasta una segunda temperatura inferior. La segunda temperatura tal como se describe en el presente documento puede estar entre 25°C y 36°C, o entre 26°C y 36°C, o entre 27°C y 36°C, o entre 28°C y 36°C, o entre 29°C y 36°C. En realizaciones preferidas, la segunda temperatura puede estar entre 30°C y 36°C, o entre 30,5°C y 36°C, o entre 31°C y 36°C, o entre 32°C y 36°C, o entre 33°C y 36°C, o entre 34°C y 36°C, o entre 35°C y 36°C, o entre 30°C y 35°C, o entre 30,5°C y 35°C, o entre 31°C y 35°C, o entre 32°C y 35°C, o entre 33°C y 35°C, o entre 34°C y 35°C, o entre 30°C y 34°C, o entre 30,5°C y 34°C, o entre 31°C y 34°C, o entre 32°C y 34°C, o entre 33°C y 34°C. En realizaciones preferidas, la segunda temperatura puede ser de 30°C, 30,5°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, o 35°C o puede estar dentro de un intervalo definido por cualquier combinación de dos de estas temperaturas. La segunda temperatura de incubación está entre 30°C y 35°C o preferiblemente entre 30°C y 34°C. Más preferiblemente, la segunda temperatura de incubación está entre aproximadamente 31°C y aproximadamente 34°C, o entre 31°C y 34°C, más preferiblemente entre 31°C y 33°C. Lo más preferiblemente, la segunda temperatura de incubación es de aproximadamente 32°C o es de 32°C.

El cultivo celular de células huésped se incuba a la segunda temperatura durante la duración de un segundo periodo de cultivo. El segundo periodo de cultivo puede estar entre 1 y 20 horas, pero puede ser más corto o más largo según el cultivo celular real. En realizaciones preferidas, el segundo periodo de cultivo puede ser de 1 a 20 horas, o de 2 a 16 horas, o de 3 a 14 horas, o de 3 a 10 horas, o de 3 a 8 horas, o de 3 a 6 horas, o de 4 a 14 horas, o de 4 a 10 horas, o de 4 a 8 horas, o de 4 a 6 horas, preferiblemente de 5 horas. En particular, el segundo periodo de cultivo puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 horas, o puede ser un periodo definido por cualquier combinación de dos de estos valores.

pH

El pH puede mantenerse durante el primer y/o segundo periodo/temperatura de cultivo dentro de valores específicos. Los inventores han encontrado que un pH entre 6 y 8 es particularmente beneficioso y promueve además un alto rendimiento de la proteína expresada, con un pH entre 6,8 y 7,2 siendo particularmente preferido. Los métodos descritos en el presente documento pueden, por tanto, comprender una o más etapas de medición del pH. El pH puede mantenerse durante el primer y/o segundo periodo/temperatura de cultivo dentro de un intervalo de entre 6 y 8, o 6,5 y 7,8, o 6,6 y 7,4, o 6,7 y 7,3, o 6,8 y 7,2, o 6,9 y 7,1, o 6,9 y 7,0; o 6,6 y 7,2, o 6,7 y 7,2, o 6,8 y 7,2, o 6,9 y 7,2, o 7,0 y 7,2, o 7,1 y 7,2; o 6,6 y 7,1, o 6,7 y 7,1, o 6,8 y 7,1, o 6,9 y 7,1, o 7,0 y 7,1; o 6,6 y 7,0, o 6,7 y 7,0, o 6,8 y 7,0, o 6,9 y 7,0. El pH puede mantenerse durante el primer y/o segundo periodo/temperatura de cultivo dentro de un intervalo de entre 6,8 y 7,2, o entre 6,9 y 7,2, o entre 7,0 y 7,2, o entre 7,1 y 7,2; o entre 6,8 y 7,3, o entre 6,9 y 7,3, o entre 7,0 y 7,3, o entre 7,1 y 7,3, o entre 7,2 y 7,3; o entre 6,8 y 7,7, o entre 6,9 y 7,7, o entre 7,0 y 7,7, o entre 7,1 y 7,7, o entre 7,2 y 7,7, o entre 7,3 y 7,7, o entre 7,4 y 7,7, o entre 7,5 y 7,7, o entre 7,6 y 7,7. En particular, el pH puede ser de (aproximadamente) 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, o puede ser un intervalo definido por cualquier combinación de dos de estos valores. El pH al primer periodo/temperatura de cultivo puede ser diferente del pH al segundo periodo/temperatura de cultivo.

Densidad óptica

La temperatura de cultivo de la invención se reduce desde una primera hasta una segunda temperatura según la densidad óptica del cultivo celular. Los inventores han encontrado que cambiar la temperatura según la densidad óptica puede tener un efecto positivo adicional sobre el rendimiento de la proteína expresada. Se ha encontrado que una reducción de la temperatura cuando la DO a 600 nm está entre 10 y 50 es beneficiosa, siendo particularmente beneficiosa entre 27 y 33. Los métodos descritos en el presente documento pueden, por tanto, comprender una etapa de medir la densidad óptica (DO). La temperatura puede disminuirse desde la primera hasta la segunda temperatura de cultivo cuando el cultivo celular alcanza una densidad óptica a 600 nm de entre 10 y 50, o entre 15 y 45, o entre 20 y 40, o entre 24 y 36, o entre 27 y 33. La temperatura puede disminuirse desde la primera hasta la segunda temperatura de cultivo cuando el cultivo celular alcanza una densidad óptica a 600 nm de entre 27 y 32, o 27 y 31, o 27 y 30, o entre 27 y 29 o entre 27 y 28; o entre 28 y 32, o entre 28 y 31, o entre 28 y 30, o entre 28 y 29; o entre 29 y 32, o entre 29 y 32, o entre 29 y 31, o entre 29 y 30, o entre 30 y 32, o 30 y 31, o entre 31 y 32. La temperatura puede disminuirse desde la primera hasta la segunda temperatura de cultivo cuando el cultivo celular alcanza una densidad óptica a 600 nm de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ó 35, o una densidad definida por cualquier combinación de dos de estos valores.

Sistema/vector/célula huésped de expresión

Para la expresión, el polipéptido recombinante se expresa en una célula huésped. En algunas realizaciones, las

etapas (a), (b) y (c) del método descrito anteriormente pueden, por tanto, precederse por una etapa de introducción de un ácido nucleico en la célula huésped, en la que el ácido nucleico codifica para el polipéptido recombinante de interés. El ácido nucleico puede introducirse como parte de un vector. En algunas realizaciones, el método se realiza con una célula huésped que ya contiene el ácido nucleico recombinante.

Se conocen diversos sistemas de expresión y vectores de expresión adecuados para la expresión recombinante de una proteína en células bacterianas. Puede usarse cualquier vector de expresión y sistema de expresión adecuado según la presente invención. Un "vector" o "vector de expresión" es un constructo de ácido polinucleico, generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido polinucleico especificados que permiten la transcripción de una secuencia de ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector incluye una unidad de transcripción que comprende una secuencia de ácido nucleico particular que va a transcribirse unida operativamente a un promotor. El promotor es un promotor T7 inducible, que puede activarse mediante un estímulo externo, tal como adición de un agente, temperatura, etc. Un vector comprende generalmente una "región de inicio de la transcripción", una "región de terminación de la transcripción", y puede comprender un "potenciador". Un vector expresable en un huésped puede ser, por ejemplo, un plásmido autorreplicante o de replicación autónoma, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pBR322 (Fermentas), vectores pET300, vectores pDEST y vectores pET39b (Novagen) y derivados de los mismos. Puede tomarse un vector de expresión adecuado adicional del manual de laboratorio "Sambrook y Russel, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª edición 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulo 15". En algunas realizaciones, el vector se integra en el genoma de la célula huésped, es decir vector integrador. En algunas realizaciones, el vector no se integra en el genoma y se mantiene por separado en la célula, es decir vector autónomo o binario.

"Promotor" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una unidad de transcripción. Una "región promotora" es una región reguladora capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de secuencia codificante hacia 3' (dirección 3'). La región promotora comprende generalmente dominios de unión a proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa, tal como la supuesta caja -35 y la caja de Pribnow (caja -10). Además, la región promotora puede comprender el sitio de inicio de la transcripción y sitios de unión para proteínas reguladoras.

"Región de inicio de la transcripción" es una región de señal que promueve el inicio de la transcripción y que comprende la secuencia para el sitio de unión a ribosomas, tal como la secuencia Shine Dalgarno. Normalmente, la región de inicio de la transcripción se ubica en el sentido de 3' con respecto al sitio de inicio de la transcripción y se une operativamente al/a los ácido(s) nucleico(s)/gene(s) que van a expresarse.

"Región de terminación de la transcripción" se refiere a una secuencia que provoca que la ARN polimerasa termine la transcripción. La región de terminación de la transcripción es habitualmente parte de una unidad de transcripción que puede evitar transcripción no deseada de otros ácidos nucleicos/genes próximos o transcripción de otros posibles promotores y puede aumentar la estabilidad del ARNm.

Un "potenciador" es una secuencia de ácido nucleico que actúa para potenciar la transcripción de una unidad de transcripción independiente de la identidad de la unidad de transcripción, la posición de la secuencia en relación con la unidad de transcripción, o la orientación de la secuencia. Los vectores que pueden usarse según la presente invención pueden incluir opcionalmente potenciadores.

Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o una región de inicio de la transcripción tal como un sitio de unión a ribosoma se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para, por ejemplo un polipéptido, si se posiciona para facilitar la transcripción del ácido nucleico. La unión puede lograrse, por ejemplo, mediante ligación en sitios de restricción convenientes.

"Ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" o "ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico aislado y purificado" tal como se hace referencia en el presente documento puede ser ADN, ARN, o híbrido de ADN/ARN. En caso de que el ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico se sitúe en un vector, es habitualmente ADN. El ADN al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier secuencia de polidesoxinucleótidos, incluyendo, por ejemplo ADN bicatenario, ADN monocatenario, ADN bicatenario en el que una o ambas cadenas están compuestas por dos o más fragmentos, ADN bicatenario en el que una o ambas cadenas tienen una estructura principal de fosfodiéster no interrumpida, ADN que contiene una o más porciones monocatenarias y una o más porciones bicatenarias, ADN bicatenario en el que las cadenas de ADN son totalmente complementarias, ADN bicatenario en el que las cadenas de ADN son sólo parcialmente complementarias, ADN circular, ADN cerrado de manera covalente, ADN lineal, ADN reticulado de manera covalente, ADNc, ADN sintetizado por sustancias químicas, ADN semisintético, ADN biosintético, ADN aislado de manera natural, ADN digerido por enzimas, ADN fragmentado, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromo, ADN que contiene una o más especies que se producen de manera no natural o ácido nucleico. Las secuencias de ADN pueden sintetizarse mediante técnicas químicas convencionales, por ejemplo, el método fosfotriéster o por medio de métodos de síntesis

5 automatizados y métodos de PCR. La secuencia de ADN purificada y aislada también puede producirse mediante técnicas enzimáticas. El ARN al que se hace referencia en el presente documento puede ser, por ejemplo, ARN monocatenario, ARNc, ARN bicatenario, ARN bicatenario en el que una o ambas cadenas están compuestas por dos o más fragmentos, ARN bicatenario en el que una o ambas cadenas tienen una estructura principal de fosfodiéster no interrumpida, ARN que contiene una o más porciones monocatenarias y una o más porciones bicatenarias, ARN bicatenario en el que las cadenas de ARN son totalmente complementarias, ARN bicatenario en el que las cadenas de ARN son sólo parcialmente complementarias, ARN reticulado de manera covalente, ARN digerido por enzimas, ARN fragmentado, ARNm, ARN sintetizado químicamente, ARN semisintético, ARN biosintético, ARN aislado de manera natural, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y ARN marcado con fluorocromos, ARN que contiene una o más especies que no se producen de manera natural de ácido nucleico.

15 El sistema de expresión de la invención es un sistema de expresión inducible, es decir la expresión del polipéptido recombinante depende de la presencia de un inductor. El ácido nucleico que codifica para la proteína recombinante está unido operativamente en el vector de expresión con un promotor inducible. El inductor relevante puede proporcionarse directamente, por ejemplo añadiéndolo o aplicándolo al cultivo celular, o puede proporcionarse indirectamente, es decir, por medio de un segundo constructo dentro de la célula huésped. Un segundo constructo de este tipo en la célula huésped puede, tras la inducción, producir una señal para inducir la expresión del ácido nucleico. El segundo constructo puede ser parte del genoma de la célula huésped microbiana, o puede mantenerse de manera autónoma dentro de la célula.

20 Los sistemas de expresión inducible se conocen bien en la técnica. Los inductores conocidos incluyen, por ejemplo, IPTG, lactosa, NaCl, temperatura etc. La inducción con IPTG se prefiere particularmente en los métodos descritos en el presente documento. Si se usa IPTG como inductor, puede usarse a una concentración en el intervalo desde 0,1 mM hasta 1 mM, más preferiblemente desde 0,2 hasta 0,6 mM, más preferiblemente desde 0,25 hasta 0,5 mM, más preferiblemente desde 0,3 hasta 0,35 mM, más preferiblemente a una concentración de 0,33 mM.

25 El vector de expresión usado en la presente invención comprende el ácido nucleico que codifica para el polipéptido recombinante unido operativamente a un promotor T7 inducible. La expresión del ácido nucleico está desencadenada por la presencia del inductor. En el caso del promotor T7, la expresión está desencadenada por la presencia de ARN polimerasa dependiente de ADN de T7. En realizaciones preferidas, el vector de expresión puede comprender o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 4.

35 Correspondiendo a un vector de expresión de este tipo, la célula huésped usada en la presente invención contiene un sistema de expresión adecuado. El cromosoma de la célula huésped microbiana comprende un ácido nucleico para ARN polimerasa de bacteriófago, tal como la ARN polimerasa de T7. La ARN polimerasa de bacteriófago se une operativamente a un promotor lac inducible (promotor de proteína lacZ beta-galactosidasa). El promotor lac puede inducirse añadiendo IPTG (isopropil-1-tio-β-D-tiogalactopiranosido) a la célula huésped. El cromosoma de la célula huésped microbiana preferiblemente está libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno. Los inventores han encontrado que el uso de un sistema de expresión/vector de expresión de este tipo es particularmente beneficioso en los métodos descritos en el presente documento y conduce a altos rendimientos de la proteína recombinante obtenida de los cuerpos de inclusión. En particular, los inventores han encontrado que usar este sistema de expresión/vector de expresión en combinación con un esquema de cultivo tal como se describe en el presente documento, es decir (i) cultivar dicha célula huésped microbiana a una primera temperatura, comprendiendo la célula huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante, (ii) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura, y (iii) cultivar la célula huésped microbiana a la segunda temperatura, es particularmente beneficioso.

40 Por tanto, en un aspecto de la divulgación se proporciona un método para la producción de un polipéptido recombinante, que se produce en cuerpos de inclusión (en una célula huésped), comprendiendo el método las etapas de (i) introducir en una célula huésped un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido recombinante, en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor, preferiblemente un promotor inducible, (ii) cultivar dicha célula huésped microbiana a una primera temperatura, comprendiendo la célula huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido recombinante, (iii) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura, y (iv) cultivar la célula huésped microbiana a la segunda temperatura. El promotor inducible puede ser un promotor T7. El cromosoma de la célula huésped microbiana puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para ARN polimerasa de bacteriófago, opcionalmente unida operativamente a un promotor inducible tal como por ejemplo un promotor lac, y está libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno. La ARN polimerasa de bacteriófago puede ser T7 polimerasa. La expresión del polipéptido se realiza mediante la adición de un inductor (tal como por ejemplo IPTG).

50 Fue sorprendente encontrar que el sistema de expresión descrito anteriormente trabaja particularmente bien con los métodos descritos en el presente documento. En la técnica, la inducción con alta temperatura a menudo se describió como el mecanismo de inducción más común. Los presentes inventores, sin embargo, encontraron que usar un sistema de expresión impulsado por T7 tal como se describió anteriormente en combinación con el método de cultivo a dos temperaturas descrito en el presente documento da como resultado mejoras particulares respecto al rendimiento de la proteína expresada en forma activa.

En la mayoría de realizaciones preferidas, el genoma de la célula huésped comprende un ácido nucleico que codifica para ARN T7 polimerasa de bacteriófago unida operativamente a un promotor lac y está libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno. El vector comprende un ácido nucleico que codifica para el polipéptido recombinante, en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor T7. Tras la adición de IPTG, el promotor lac induce la expresión de T7 polimerasa, que luego induce la expresión de la proteína recombinante por medio del promotor T7.

Los inventores han encontrado que añadir el inductor en un punto específico durante la incubación, tal como simultánea o posteriormente para reducir la temperatura de cultivo desde la primera hasta la segunda temperatura de cultivo inferior, promueve además un alto rendimiento de la proteína recombinante obtenida de los cuerpos de inclusión. El inductor puede añadirse simultánea o posteriormente para reducir la temperatura de cultivo desde la primera hasta la segunda temperatura de cultivo inferior. En otras palabras, el inductor puede añadirse en el punto de tiempo cuando la temperatura se está reduciendo, o puede añadirse más tarde, es decir durante el segundo periodo de cultivo a la segunda temperatura de cultivo. Preferiblemente, el inductor se añade en el punto de tiempo cuando la temperatura se está reduciendo.

Introducción del ácido nucleico en la célula huésped

El vector de expresión que contiene el polipéptido recombinante de interés puede introducirse en una célula huésped usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Los términos “transformación”, “transformado” o “introducción de un ácido nucleico en una célula huésped” denotan cualquier proceso en el que un ácido nucleico extracelular como un vector, con o sin material de acompañamiento, entra en una célula huésped. El término “célula transformada” se refiere a una célula o su progenie en la que se ha introducido el ácido nucleico y que, por tanto, alberga el ácido nucleico. El ácido nucleico puede introducirse en la célula de modo que el ácido nucleico es replicable o bien como integrante cromosómico o bien como elemento extracromosómico. La transformación de células huésped apropiadas con, por ejemplo, un vector de expresión puede lograrse mediante métodos bien conocidos tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas o mediante métodos químicos tales como transformación mediada por fosfato de calcio, descritos por ejemplo en Maniatis *et al.* 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory o en Ausubel *et al.* 1994, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons.

Célula huésped

Cualquier célula microbiana que permite la expresión de una proteína recombinante en cuerpos de inclusión puede usarse según la divulgación. Las células microbianas que producen cuerpos de inclusión de proteína recombinante incluyen, por ejemplo, células bacterianas y de levadura y células de hongos filamentosos. La “célula huésped” o “huésped” puede ser cualquier célula microbiana, tal como una célula de bacteria, levadura o de hongo filamentosos. Las células de bacterias son células huésped preferidas, prefiriéndose particularmente las bacterias gram-negativas. Los ejemplos incluyen células tales como C2523, C2523 y BL21 (DE3) (todas de New England Biolabs). Una célula huésped particularmente preferida es una célula de *E. coli*. También se han descrito anteriormente células huésped adecuadas para sistemas de expresión particulares.

Los términos “huésped”, “célula huésped” y “célula huésped recombinante” se usan indistintamente en el presente documento para indicar una célula microbiana en la que se han introducido uno o más vectores o una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada. El uso en el presente documento de la forma singular “célula huésped” también indica que una pluralidad de células puede usarse, a no ser que el contexto indique lo contrario. En la práctica, en la producción de una célula huésped recombinante, se usa una pluralidad de la célula huésped en el cultivo celular.

El término “secuencia de ácido nucleico aislada y purificada” se refiere al estado en el que la secuencia de ácido nucleico estará libre o sustancialmente libre de material con el que está asociada de manera natural tal como otros ácidos nucleicos con los que se encuentra en su medio natural, o el medio en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*.

Se entiende que los términos “huésped”, “célula huésped” y “célula huésped recombinante” se refieren no solo a la célula sujeto en particular, sino también a la progenie o posible progenie de dicha célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a o bien mutaciones o bien influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún están incluidas dentro del alcance del término tal como se usa en este documento, siempre que produzcan una forma activa de la proteína recombinante o una variante funcional de la misma (véase la discusión sobre las variantes funcionales anteriormente).

En el caso de que el huésped sea una especie procarionta, la secuencia de ácido nucleico recombinante puede originarse de una familia o género diferente, de una clase u orden diferente, de un filo (división) diferente o de un dominio (imperio) diferente de organismos.

Las células huésped transformadas pueden congelarse y almacenarse. Puede prepararse un banco de células maestro y un banco de células de trabajo, y someterse a prueba para determinar la viabilidad, identidad, pureza y estabilidad.

5

Condiciones de cultivo celular adicionales

Las configuraciones generales y las condiciones de cultivo para cultivar células microbianas están bien establecidas y sólo se resumirán aquí. Los parámetros de cultivo celular convencionales pueden ajustarse basándose en el conocimiento general común en la técnica.

10

El medio de cultivo celular se inocula con una muestra de la célula microbiana huésped transformada. En la técnica se conocen medios de cultivo adecuados, incluyendo por ejemplo medio GBA, medio SOC (carbono súper óptimo), medio LB (Luria) o medio RBY. Pueden inocularse diversas cantidades de medio de cultivo. El cultivo puede ser un cultivo a pequeña escala, por ejemplo, para uso de laboratorio, por ejemplo, de 1 ml a 1 l de medio de cultivo. Los métodos descritos también son particularmente útiles para grandes volúmenes hasta escala industrial, es decir escala preparativa. Los métodos descritos en el presente documento pueden, por tanto, realizarse con volúmenes de cultivo celular mayores, incluyendo procesamiento a escala industrial para uso industrial. El cultivo puede estar en el intervalo de 1-5 l, o 1-10 l, o 1-100 l, o 1-500 l o 1-1000 l o más. El cultivo puede estar en el intervalo de 5-5000 l, o 10-5000 l, o 50-5000 l, o de 100 a 5000 l, o 5-1000 l, o 10-1000 l, o 50-1000 l o 100-1000 l.

15

20

En algunas realizaciones, se inocula en primer lugar un cultivo de simientes. El cultivo de simientes se cultiva hasta que se logra una densidad óptica especificada. El cultivo de simientes puede cultivarse hasta que la densidad óptica a 600 nm está dentro del intervalo de entre 0,5 y 1,5, o entre 0,6 y 1,4, o entre 0,7 y 1,3, o entre 0,8 y 1,2, o entre 0,9 y 1,1. Una densidad óptica preferida está dentro del intervalo de entre 0,9 y 1,1.

25

El cultivo de simientes puede transferirse entonces a un biorreactor más grande con medio nuevo.

30

El experto sabrá que es necesario controlar, por ejemplo, los niveles de oxígeno disuelto y los nutrientes en el cultivo celular para asegurar un crecimiento celular eficiente.

35

La tasa de alimentación puede ser lineal. En algunas realizaciones, cuando el nivel de oxígeno disuelto (DO) comienza a aumentar abruptamente desde el punto de ajuste, provocado por agotamiento de la fuente de carbono, la adición de alimentación lineal puede iniciarse. El punto de ajuste de DO puede estar entre el 10% y el 50%, entre el 20% y el 45%, entre el 30% y el 45%, entre el 35% y el 45%, entre el 37% y el 42%, o entre el 39% y el 40%. El DO puede ser del 35%, el 36%, el 37%, el 38%, el 39%, el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44% o el 45%, o el DO puede ser cualquier combinación de dos de estos valores. Preferiblemente, el DO es del 40%.

40

En la técnica se conocen nutrientes adecuados. Como fuente de carbono puede usarse un alcohol de azúcar, preferiblemente glicerol, en el medio. Los inventores han encontrado que glicerol como fuente de carbono da como resultado altas tasas de crecimiento y una elevada biomasa. La composición del medio de alimentación puede comprender, entre otros, aminoácidos (principalmente L-metionina, L-glutamina y L-leucina) y minerales (por ejemplo sales, fosfato, sulfato). Todos los materiales usados son de fuentes no animales.

45

Pueden usarse uno o más agentes antiespumantes o agentes de selección. Como agentes antiespumantes pueden usarse PPG2000, JM633, SB2020. El caldo de fermentación puede comprender además monosulfato de kanamicina (un antibiótico aminoglicósido) como agente de selección.

50

Pueden estar presentes componentes adicionales, según las células huésped reales usadas.

Procesamiento posterior

55

“Procesamiento posterior” comprende el procesamiento adicional de las células recogidas del cultivo. Las células contienen los cuerpos de inclusión con la proteína recombinante.

60

Tras el cultivo del cultivo celular que comprende las células huésped transformadas, las células pueden separarse del medio de cultivo usando separadores o centrifugación a baja velocidad. Después de la lisis de las células, se obtienen los cuerpos de inclusión que contienen la proteína recombinante. En algunas realizaciones, el método descrito en cualquier parte en el presente documento puede, por tanto, comprender adicionalmente una etapa de obtener los cuerpos de inclusión de la(s) célula(s) huésped.

65

Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse mediante métodos convencionales. Los procesos para obtener los cuerpos de inclusión de células huésped comprenden generalmente lisis y alteración de las células seguido por centrifugación. Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse recogiendo las células en un separador (por ejemplo a aproximadamente 11 000 g, por ejemplo mediante centrifugación,), alterando mecánicamente las células, por ejemplo con un homogeneizador a alta presión (por ejemplo a aproximadamente 1000 bar), y separando entonces

los cuerpos de inclusión del residuo celular en un separador (por ejemplo a aproximadamente 11 000 g, por ejemplo mediante centrifugación). El sedimento que comprende una gran proporción de cuerpos de inclusión clásicos se lava habitualmente con tampones adecuados que incluyen detergentes. Los cuerpos de inclusión pueden almacenarse en un tampón adecuado. Los tampones adecuados son cualquier tampón biológicamente aceptable, como por ejemplo tampón fosfato, citrato, acetato, tartrato, o agua. Los cuerpos de inclusión pueden almacenarse en un tampón adecuado a -80°C durante al menos 8 meses o propagarse adicionalmente sin una etapa de retención.

Para el aislamiento de G-CSF, se ha notificado que es conveniente el lavado de cuerpos de inclusión clásicos con por ejemplo, desoxicolato al 1% (Zsebo KM *et al* (1986) *Immunobiology* 172:175-184. Documentos EP237545; US5849883) o con una disolución de NaCl 1,0 M con Tween 80 al 0,1% añadido (Gelunaite L *et al* (2000) *J Chromatogr A* 904:131-143).

Después de que los cuerpos de inclusión se hayan obtenido, la proteína recombinante debe solubilizarse de los cuerpos de inclusión. En algunas realizaciones, el método descrito en cualquier parte en el presente documento puede comprender además las etapas de (i) obtener los cuerpos de inclusión y (ii) obtener la proteína recombinante de los cuerpos de inclusión. La divulgación también proporciona una proteína recombinante que puede obtenerse u obtenida mediante los métodos descritos en el presente documento.

La obtención de los cuerpos de inclusión puede lograrse usando técnicas comunes, tal como se estableció anteriormente. Para la producción de proteínas biológicamente activas plegadas correctamente de cuerpos de inclusión que son insolubles en líquidos basados en agua o tampones acuosos comunes en condiciones nativas, los cuerpos de inclusión se aíslan de las células, se lavan y se solubilizan, y entonces se realiza renaturalización *in vitro*.

La obtención de la proteína recombinante de los cuerpos de inclusión puede lograrse usando técnicas comunes. Por ejemplo, el documento EP0219874 divulga métodos genéricos para el replegamiento de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Para la solubilización, se usaron los agentes caotrópicos GuHCl y arginina a pH elevado. El documento EP0219874 describe la formación de puentes disulfuro en condiciones rédox proporcionado por GSH/GSSG. Métodos para obtener G-CSF soluble monomérico se describen, por ejemplo, en Zsebo 1986, documento WO87/01132, Devlin 1988, Holloway 1994, documentos WO01/04154, US5055555. Se describieron procesos adicionales en el documento WO89/10932, Lu 1992, Heidari 2001, Wingfield 1988, Kang 1998, documento WO98/53072, Wang 2005, documentos WO01/87925, WO2004/015124, WO2004/001056, WO2006/097944, WO2006/135176, EP1630173, EP1837346, Rao 2008, Khalilzadeh 2008, documentos WO2008/096370, WO2010/146599.

Por ejemplo los documentos WO89/10932 y EP0719860 describen un procedimiento para aislar y purificar G-CSF recombinante a partir de un microorganismo. El método descrito en los documentos WO89/10932 y EP0719860 comprende lisar el microorganismo y separar material insoluble que contiene G-CSF de material proteínico soluble; solubilizar y oxidar el G-CSF en presencia de un agente solubilizante y un agente oxidante; eliminar el agente solubilizante usando una resina de intercambio iónico DOWEX que tiene una matriz polimérica de estireno-divinilbenceno reticulada; someter el G-CSF a cromatografía de intercambio iónico; y recuperar el G-CSF purificado. La cromatografía de intercambio iónico puede ser una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) seguido por una cromatografía de intercambio catiónico (CEX). La lisis celular puede realizarse con un homogeneizador Gaulin con posterior centrifugación para recoger el sedimento. El lavado de los cuerpos de inclusión puede realizarse con, por ejemplo, desoxicolato u otra sal biliar o detergente no iónico. El agente solubilizante puede ser sarcosilo, el agente oxidante puede ser sulfato de cobre. El sarcosilo pudo entonces eliminarse usando adsorción por lotes con Dowex u otra resina de intercambio aniónico. Entonces pueden usarse posteriores cromatografías de AEX y/o CEX para pulido.

Un procedimiento de purificación de este tipo permite obtener G-CSF como forma soluble, monomérica y correctamente plegada de los cuerpos de inclusión. La proteína puede purificarse adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico en forma monomérica y oxidada únicamente. Agregados, proteínas diméricas o plegadas incorrectamente de otro modo, precipitarían y permanecerían en filtros y en la columna. G-CSF es activo biológicamente en forma monomérica, correctamente plegada.

Por tanto, puede suponerse que G-CSF solubilizado monomérico obtenido de los métodos descritos en el presente documento está plegado correctamente y es, por tanto, biológicamente activo. La actividad biológica de G-CSF puede someterse a prueba usando métodos establecidos en el ejemplo 13.

Los inventores también describen en el presente documento un método de procesamiento posterior nuevo e inventivo, que puede usarse en combinación con los métodos de cultivo celular anteriores (fermentación) descritos en el presente documento. Conduce a rendimientos aumentados adicionales de proteína recombinante plegada correctamente. Los métodos de procesamiento posterior comprenden las etapas de solubilizar la proteína recombinante, realizar una oxidación y primera etapa de replegamiento, eliminar el agente solubilizante y realizar una segunda etapa de replegamiento. En particular, los métodos de cultivo descritos en el presente documento pueden realizarse en combinación con un método para replegar la proteína recombinante de cuerpos de inclusión, que comprende:

a) solubilizar la proteína recombinante en presencia de un agente solubilizante;

5 b) realizar una oxidación y primera etapa de replegamiento, que comprende incubar la proteína recombinante en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante;

c) eliminar el agente solubilizante mediante la adsorción en resina de intercambio iónico y/o cromatografía de intercambio iónico, y opcionalmente realizar una precipitación de ácido; y

10 d) realizar una segunda etapa de replegamiento, que comprende diluir e incubar la proteína recombinante de la etapa (c) en ausencia de agente solubilizante.

15 Los cuerpos de inclusión descritos en el presente documento pueden obtenerse de un microorganismo, preferiblemente de *E. coli*. El agente solubilizante puede ser N-lauroilsarcosina. El agente oxidante puede ser CuSO_4 . La solubilización puede realizarse a un valor de pH mayor que pH 7. El agente solubilizante puede ser N-lauroilsarcosina a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5%. La oxidación y primera etapa de replegamiento pueden realizarse durante al menos dos horas. La oxidación y primera etapa de replegamiento pueden realizarse con flujo de aire y sin enfriamiento. La oxidación y primera etapa de replegamiento pueden realizarse a un valor de pH de aproximadamente 7-9 y/o a una temperatura de aproximadamente 20-28°C y/o durante aproximadamente 15-25 horas.

20 La eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) anterior puede comprender: AEX (intercambio aniónico) y CEX (intercambio catiónico), opcionalmente en este orden. La eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) anterior puede comprender:

25 a) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de proteína recombinante con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina mediante filtración, y/o

30 b) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y la proteína recombinante permanece en el flujo a través y/o,

c) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que la proteína recombinante se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo a través.

35 El agente solubilizante y otras impurezas pueden eliminarse mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas: AEX, precipitación de ácido, AEX y CEX. El agente solubilizante y otras impurezas pueden eliminarse mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:

40 a) unión del agente solubilizante a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de proteína recombinante con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina mediante filtración;

b) precipitación de impurezas reduciendo el pH por debajo de pH 5 y mediante eliminación del precipitado mediante filtración;

45 c) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que el agente solubilizante residual se une a la resina y la proteína recombinante permanece en el flujo a través;

50 d) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que la proteína recombinante se une a la resina y el agente solubilizante residual permanece en el flujo a través; y

e) elución de proteína recombinante unida de la resina de intercambio catiónico mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con concentración de sal o pH aumentados.

55 La segunda etapa de replegamiento puede realizarse en un tampón de baja conductividad y/o en condiciones enfriadas y/o durante más de 12 horas. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse a una conductividad por debajo de 2,0 mS/cm, y/o a una temperatura de aproximadamente 2-8°C y/o durante al menos 24 horas. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse a un valor de pH por encima de pH 7.

60 El método para replegar la proteína recombinante a partir de cuerpos de inclusión descritos anteriormente puede comprender además una etapa de pulido, que puede comprender una o más cromatografías de intercambio iónico. La una o más cromatografías de intercambio iónico en la etapa de pulido pueden comprender una cromatografía de intercambio aniónico seguida de una cromatografía de intercambio catiónico.

65 Las diversas etapas se describen ahora:

Solubilización: El recombinante de la fracción IB se solubiliza en presencia de un agente solubilizante. Puede usarse

cualquier agente solubilizante adecuado. Tales agentes solubilizantes pueden seleccionarse de, por ejemplo, (pero no se limitan a) el grupo de un desnaturizante o un agente caotrópico, tal como por ejemplo (pero sin limitarse a) GuHCl o urea, o el grupo de un detergente, un agente de superficie o un tensioactivo, tal como por ejemplo (pero sin limitarse a) N-lauroilsarcosina (sarcosilo), ácido laúrico, dodecilsulfato de sodio (SDS) o cloruro de N-cetiltrimetilamonio. En realizaciones preferidas, la solubilización se realiza con sarcosilo a pH alcalino, preferiblemente pH 8, preferiblemente a una concentración de sarcosilo del 0,2-2,0% (p/v), en realizaciones más preferidas aproximadamente el 0,5%-1% (p/v) y lo más preferiblemente aproximadamente el 1% (p/v) o el 1% (p/v). El tampón preferido para la solubilización es Tris-HCl/pH 8, preferiblemente Tris-HCl 40 mM/pH 8. Después de la solubilización, puede realizarse una etapa de dilución, con agua o tampón de baja conductividad (es decir, una conductividad de al menos por debajo de 2 mS/cm, más preferiblemente por debajo de 1 mS/cm).

Primer replegamiento (plegamiento oxidativo): Se realiza una primera etapa de replegamiento oxidativo en presencia del agente solubilizante, tal como sarcosilo, y un agente oxidante, tal como CuSO_4 (u otros tales como oxígeno o flujo de aire (burbujeo), GSSG (glutación-ox), iones metálicos (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} ,...) peróxido (H_2O_2)), en cantidades eficaces. Los inventores encontraron que en presencia de agente solubilizante, tal como sarcosilo, el plegamiento de la proteína recombinante no podía lograrse completamente. Los inventores han encontrado que la eliminación completa del agente solubilizante seguida de una segunda etapa de replegamiento en ausencia de agente solubilizante conduce a rendimiento mejorado de proteína recombinante.

Eliminación de agente solubilizante y oxidante y eliminación de otros contaminantes: Puede usarse cualquier método de eliminación adecuado. Por ejemplo, puede lograrse suficiente eliminación mediante adsorción en resina de intercambio iónico, y/o precipitación de ácido, y/o cromatografía de intercambio iónico. Aplicar una cualquiera o una combinación de estas técnicas da como resultado una concentración del agente solubilizante, tal como sarcosilo, que no interferirá con el replegamiento en la segunda etapa de replegamiento, preferiblemente por debajo de 0,01 mg/ml, preferiblemente por debajo del límite de detección. (La concentración de agente solubilizante residual puede medirse mediante HPLC y detección mediante UV. El método se describe en más detalle en Burgess, R. R. 1996. Purification of over produced E. coli RNA polimerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. Methods Enzymol. 273:145-149). Estas etapas de purificación puede aplicarse en cualquier orden y/o en cualquier combinación, siempre que conduzca a una eliminación completa del agente solubilizante. También pueden usarse otros métodos de purificación adecuados. El agente solubilizante y otras impurezas pueden eliminarse mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas: AEX, precipitación de ácido, AEX y CEX. En la técnica se conocen condiciones y materiales adecuados para realizar adsorción de resina de intercambio iónico, precipitación de ácido y cromatografía de intercambio iónico, tal como AEX o CEX, y están disponibles comercialmente.

Segundo replegamiento (finalización del plegamiento): La segunda etapa de replegamiento comprende diluir, tal como dos veces con agua o tampón de baja conductividad, y después incubar el G-CSF parcialmente replegado, preferiblemente en un pH ligeramente alcalino, tal como pH 8. Un tampón preferido para la segunda etapa de replegamiento es Tris-HCl/pH 8, preferiblemente Tris-HCl 10 mM/pH 8.

Purificación final (etapa(s) de pulido): Pueden realizarse opcionalmente etapas de pulido adicionales, que incluyen opcionalmente AEX y/o CEX, hasta que se logra un grado deseado de pureza de la proteína recombinante.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de G-CSF

Material y métodos

1. Generación de una línea celular huésped

Preparación de casete de ARN polimerasa de T7

Con el fin de aislar el casete génico de 4,44 kb que contiene la ARN polimerasa de T7 funcional (número de registro AY264774, proteína AAP33914.1] unida operativamente a los dominios reguladores del operón lac, se usó el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagene). Se preparó el ADN con el kit Quiagen Genomic tip-20 (Quiagen, Hilden, Alemania) usando un protocolo convencional. El casete de T7 se amplificó entonces mediante reacción PCR. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 100 μl utilizando la ADN polimerasa KOD HiFi (Merck, Darmstadt, Alemania). La mezcla de reacción contenía tampón ADN polimerasa, ADN polimerasa 5U KOD HiFi, MgCl_2 2 mM, dNTPs 250 μM , 100 ng de molde de ADN, cebador directo 10 μM (IntLambd 1), cebador inverso 10 μM (IntLambd 2). Para la reacción, se usó un ciclador de PCR [MJ Research PTC-200] con los siguientes ajustes: desnaturización a 98°C durante 30 s, seguido por 35 ciclos con 30 s a 98°C (desnaturización), 30 s a 65°C (hibridación), 2 min a 72°C (síntesis). Se realizó la síntesis final durante 10 min a 72°C.

Se usaron los siguientes cebadores del gen Int de fago lambda para la reacción PCR:

IntLambd 1: GTCCGACTTATGCCCGAGAAGATGTTGAGCAAACCTTATCGCTTATC

IntLambd 2: TGCAAAGAGATTCTTGGCGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCG

5 Se purificó el ADN de la disolución de PCR con kit de limpieza Montage PCR de Millipore. Se añadió disolución de solubilización en gel de tres volúmenes del kit de extracción de gel Qiaquick a la disolución de reacción, luego se centrifugaron las muestras. Después de eso, se añadieron 400 μ l de agua y mezcla de disolución de solubilización en gel (mezclada en proporción 1:3). Después de la centrifugación, se lavó el ADN retenido en el filtro con tampón TE 3x400 μ l y luego se llevó el ADN a 45 μ l de agua estéril. Se añadieron 5 μ l de tampón BamHI al producto de PCR
10 aislado y se digirió la muestra con 10 unidades de enzima de restricción BamHI durante 4 horas a 37°C y luego se purificó, según el procedimiento descrito anteriormente. Se purificó el plásmido pBR322 de células XL1-Blue MRF usando el kit HiSpeed Plasmid Midi. Se digirió 1 μ g del plásmido purificado con 5 unidades de enzima BamHI durante 4 horas a 37°C en una mezcla de reacción de 20 μ l preparada con tampón BamHI. Con el fin de evitar el cierre automático del vector, se escindió el grupo fosfato unido al extremo mediante digestión con 0,5 unidades de
15 enzima BAP (fosfatasa alcalina bacteriana) (incubación durante 30 minutos a 60°C). Se separó el vector en gel de agarosa TAE al 1% y se purificó usando kit de extracción de gel Qiaquick. Se realizó la purificación según el protocolo KIT, y al final se eluyó el vector en volumen de 50 μ l. Se mezclaron y se trataron el vector purificado y el inserto con ADN ligasa de T4 durante la noche a 16°C en mezcla de reacción de 200 μ l. Después del tratamiento, se precipitó el ADN con 3 volúmenes de etanol, y tras la evaporación se disolvió en 50 μ l de agua estéril.

20 Generación de constructo de integración

Para la introducción del casete de ARN polimerasa de T7 aislado anterior en el ADN cromosómico de la cepa de *E. coli* BL21 modificada C2523H (New England Biolabs) se clonó el casete de ARN polimerasa de T7 aislado anterior en el plásmido 705-pmj. Este plásmido comprende un origen de replicación sensible a la temperatura.

Con el fin de preparar el constructo de integración, se escindió el inserto del plásmido 4 μ gpBR322/T7, obtenido de células XL1-Blue MRF [Stratagene] usando kit HiSpeed Plasmid Midi mediante enzima ClaI/SalI en 50 μ l de disolución de tampón SalI. La digestión continuó 4 horas a 37°C. La digestión dio como resultado dos fragmentos, el
30 fragmento ClaI/SalI del fragmento que contiene polimerasa de T7 y pBR322.

Se obtuvo el vector pLacZ de las células XL1-Blue MRF usando kit HiSpeed Plasmid Midi. Se eliminó el extremo del gen LacZ del vector pLacZ aplicando enzimas EcoRI/ClaI durante 4 horas a 37°C. Se digirieron parcialmente 2 μ g del plásmido 705-pMJ transformado con DH5a [Invitrogen] [Gene Bridges GmbH] purificado usando el kit HiSpeed
35 Plasmid Midi en tampón EcoRI con 0,01 unidades de enzima EcoRI durante 30 minutos. Se purificó el ADN plasmídico digerido parcialmente mediante el kit de extracción QIAquickGel, luego se digirió en tampón SalI con enzima SalI durante 4 horas a 37°C y luego se desfosforiló el plásmido con 0,5 unidades de enzima BAP (fosfatasa alcalina bacteriana) durante 30 minutos a 60°C.

40 Se ejecutaron los insertos y el vector sobre un gel de agarosa TAE al 1% y se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick, respectivamente, luego se mezclaron y se ligaron durante 16 horas en un volumen de 200 μ l.

Después de eso, se precipitó el ADN con etanol, y tras la evaporación se electroporó en células DH5 α que contenían el gen de proteína RFP insertada en un vector pET3d (para la multiplicación de plásmido 705-pMJ y sus derivados, se usaron células DH5 α con el fin de obtenerlo en la cantidad apropiada). Se multiplicaron cuatro de las células rojas y se analizó el plásmido para determinar si contiene todo el inserto. Se designó el constructo obtenido pMJLacI-LacUV-T7Pol-LacZ. Posteriormente, se purificó el plásmido pMJ-LacI-LacUV-T7Pol-LacZ con el kit HiSpeed Plasmid
45 Midi (Quiagen) y luego se transformó en células BL21 modificadas C2523.

50 2. Generación de vector de expresión de G-CSF y la célula huésped transformada

Vector de expresión de G-CSF:

Se construyó un vector de expresión específico para G-CSF. La secuencia de ADNc humano de longitud completa de 525 pb de longitud para factor estimulante de colonias de granulocitos N-(L-metionil) (metuG-CSF) codifica para una proteína idéntica a la isoforma de 174 aminoácidos de G-CSF humano con un residuo de metionina N-terminal adicional tal como se publica, por ejemplo, en el documento EP 0 401 384.

Se creó el constructo de expresión insertando el ADN de r-metuG-CSF [número de registro AR049895] en la posición NdeI-XhoI de un vector pET39b modificado (New England Biolabs), creando el plásmido pRG/GCSFa, tal como se describe en Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, vol. 1, 2, 3 (1989) y Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 1985.

El vector pRG/GCSFa de 5234 pb de longitud contiene: gen de resistencia a antibióticos (kanamicina) (Kan), posición: 822-7, promotor T7, gen r-metuG-CSF sintético (G-CSF), terminador de T7, represor lacI (LacI), y un origen
65

de replicación (Ori). En la figura 1 se representa una vista general esquemática del vector.

Se transformó el vector en la célula huésped obtenida en el punto 1 usando electroporación.

5 3. Cultivo celular

Se inocularon 100 ml de medio de cultivo de simientes estéril (RBY) con la suspensión celular bacteriana del WCB (banco de células de trabajo) en condiciones asépticas. Se incubó el cultivo de simientes inoculado a 37°C con agitación constante a 185 rpm durante 24 horas. Cuando la densidad óptica del cultivo de simientes alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 1,0, se transfiere el cultivo de simientes a un biorreactor de 20 l (con volumen de trabajo de 15 l). Se incubó el cultivo de simientes inoculado durante 18 horas a 37°C con agitación constante a 400 rpm y aireación a una velocidad de 15 l/min. Cuando la densidad óptica a 600 nm del cultivo de simientes ha alcanzado aproximadamente 0,9, se transfiere el cultivo de simientes recogido a un biorreactor de 1000 l (con volumen de trabajo de 500 l) con medio GBA, que contiene componente sintético y glicerol como fuente de carbono. Se realizó el cultivo en condiciones aerobias estrictas (DO \geq 30%) en un cultivo sumergido a 37°C. Durante todo el periodo de cultivo, se mantuvo el valor de pH a un intervalo de 6,8 - 7,2.

Cuando el nivel de oxígeno disuelto (DO) empezó a aumentar abruptamente desde el punto de ajuste (DO=40%), se inició la adición de alimentación lineal. Cuando la densidad óptica del cultivo ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de 30, se disminuyó la temperatura de fermentación hasta una temperatura de 32°C. Posterior a la reducción de la temperatura, se añadió IPTG al cultivo para inducir una expresión de proteínas diana de alto nivel. Después de 5 horas tras el periodo de inducción, se detuvo la fermentación suprimiendo la alimentación de la fuente de carbono y disminuyendo la agitación y aireación, se enfrió el cultivo celular por debajo de 15°C y se recogieron las células. La fermentación principal total tomó 21 horas.

Se usó glicerol como fuente de carbono en el medio. El glicerol como fuente de carbono dio como resultado altas tasas de crecimiento y una elevada biomasa. La composición del medio de alimentación comprendía aminoácidos (L-metionina, L-glutamina y L-leucina) y minerales (por ejemplo sales, fosfato, sulfato). Todos los materiales usados fueron de fuentes no animales. Se usó SB2020 como agentes antiespumantes. El caldo de fermentación comprendía además monosulfato de kanamicina (un antibiótico aminoglicósido) como agente de selección.

4. Procesamiento intermedio

1. Preparación de cuerpos de inclusión (IB)

Después de la fermentación, se realizó la preparación de los cuerpos de inclusión. Se detuvieron la agitación, la aireación y la alimentación de las fuentes de carbono, se enfrió el cultivo por debajo de 15°C y las bacterias se recogieron por separación a 11 000 g. Las células sedimentaron en el rotor y se lavaron (descargaron) con agua. Se recogió el concentrado de células bacterianas, se diluyó de nuevo hasta la mitad del volumen con agua y se añadió NaH₂PO₄ 0,5 M hasta una concentración final de 10 mM. Se rompieron las células a presión (100 MPa) al pasar por un homogeneizador tres veces. Se separaron los cuerpos de inclusión de los residuos celulares mediante sedimentación en un separador a 11 000 g. Se descargaron los cuerpos de inclusión sedimentados en un tampón de lavado que contenía DTT 5 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 5 mM y Tween 20 al 2% a pH 7,2. Se diluyó la suspensión concentrada de IB 2 veces con el mismo tampón y se sedimentó nuevamente. Se repitió este procedimiento de lavado dos veces utilizando tampón NaH₂PO₄ 10 mM, al final del segundo procedimiento sin dilución. Se almacenó el sedimento final de los IB congelado a -80°C y fue estable durante 8 meses.

Después de descongelar los cuerpos de inclusión, el G-CSF puede solubilizarse, replegarse y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien establecidas en las técnicas. Un proceso adecuado se describe, por ejemplo, en el documento US5849883.

Resultados

La tabla 1 presenta los resultados de la fermentación de la célula huésped transformada descrita anteriormente, en la que la primera temperatura de cultivo era de 37°C, y la segunda temperatura de cultivo era de 25°C, 30°C, 32°C, 35°C o 37°C, respectivamente.

Los resultados indican claramente que reducir la temperatura durante el cultivo conduce a un rendimiento aumentado de G-CSF solubilizado. En particular, es evidente que la incubación a una segunda temperatura de cultivo de entre 32°C y 35°C conduce a un rendimiento aumentado. Una segunda temperatura de incubación de 32°C fue particularmente eficaz.

Ejemplo 2: Fermentación y expresión

Se produjo el G-CSF (filgrastim) con el clon C2523 T7 pol pRG/GCSFa de *E. coli* recombinante (*E. coli* transformada con un vector de expresión que comprende G-CSF). En condiciones asépticas, se inoculó el medio de cultivo de

simientes preparado con 0,10-0,15 cm³ de suspensiones celulares obtenidas de un vial de banco de células de trabajo descongelado que se almacenó en nitrógeno líquido. Se incubaron los matraces de cultivo de simientes inoculados en un incubador con agitador giratorio a 37°C a 185 rpm durante 24-28 horas. Cuando el valor medio de la densidad óptica a 600 nm (OD) de los seis cultivos de matraz agitados alcanzó 0,9-1,1, se recogió el contenido del matraz en un matraz de vidrio de 5 dm³ estéril equipado con un tubo de silicona. Se transfirió el cultivo de simientes con un volumen de 3 dm³ recogido con una bomba WM323U/R al fermentador de 100 dm³ llenado hasta 75 dm³ con medio de producción estéril y complementado (GBA, medio sintético con glicerol como fuente de carbono). Se realizó el cultivo en condiciones aerobias estrictas en un cultivo sumergido a 37°C. Cuando la fuente de carbono se agotó del medio, se añadió una disolución de alimentación de glicerol al cultivo en tasas apropiadas. Se mantuvo la tensión de oxígeno disuelto a un nivel de no menos del 30% durante todo el periodo de cultivo. Cuando el valor de DO del cultivo alcanzó 30, se disminuyó la temperatura hasta 32°C y se añadió IPTG 0,33 mM para inducir la expresión de G-CSF. Se cultivaron adicionalmente las bacterias para producir G-CSF durante 5 horas hasta una OD de 80-95.

15 *Ejemplo 3: Recogida de bacterias*

Se detuvieron la agitación, aireación y fuentes de carbono de alimentación, se enfrió el cultivo por debajo de 15°C, y se recogieron las bacterias por separación a 11000 g. Las células sedimentaron en el rotor y se lavaron (descargaron) con agua. Se recogió el concentrado de células bacterianas, se diluyó de nuevo hasta la mitad de su volumen con agua, y se añadió NaH₂PO₄ 0,5M hasta una concentración final de 10 mM. La masa total de las células bacterianas húmedas (biomasa) era de aproximadamente 10-11,5 kg.

Ejemplo 4: Lisis de bacterias y preparación de cuerpos de inclusión

25 Se rompieron las bacterias separadas y lavadas a presión (100 MPa) al pasar a través de un homogeneizador tres veces. Se separaron los cuerpos de inclusión de residuos celulares mediante sedimentación en un separador a 11000 g. Se descargaron los cuerpos de inclusión sedimentados en tampón de lavado que contiene DTT 5 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 5 mM y Tween 20 al 2% a pH 7,2. Se diluyó la suspensión de IB concentrada 2 veces con el mismo tampón y se sedimentó de nuevo. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces usando tampón NaH₂PO₄ 10 mM, al final del segundo procedimiento sin dilución. Se almacenó el sedimento final de IB congelado a -80°C.

Ejemplo 5: Solubilización de cuerpos de inclusión

35 Se descongelaron los cuerpos de inclusión congelados (650 g de masa húmeda) y se disolvieron en tampón de solubilización que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 8 y N-lauroilsarcosina (sarcosilo) al 1% (p/v) en un volumen total de 32,5 dm³. Se incubó la suspensión a temperatura ambiente con agitación continua.

Ejemplo 6: Replegamiento oxidativo (1^{er} replegamiento)

40 Se diluyó la suspensión de IB solubilizada 2 veces con agua hasta sarcosilo al 0,5% y Tris-HCl 20 mM como concentraciones finales en un volumen total de 65 dm³. Se añadió CuSO₄ a una concentración final de 40 µM. Se oxidó G-CSF y se replegó parcialmente durante la agitación continua y flujo de aire en el espacio de cabeza a temperatura ambiente durante al menos 20 horas. Se terminó la oxidación mediante la adición de EDTA a una concentración final de 1 mM.

Ejemplo 7: Eliminación de sarcosilo mediante adsorción por lotes de AEX

50 Se adsorbió sarcosilo a una resina de intercambio aniónico (AEX) en un modo por lotes. Se aplicó una cantidad de 20 g de resina AG 1-X8 (BioRad, EE.UU.) por gramo de sarcosilo y se añadió a la disolución. Se agitó la suspensión durante dos horas para unir la mayor parte del sarcosilo. Se eliminó la resina mediante filtración a través de una malla de filtro de bolsa de nailon de tamaño de poro de 100 µm. Se eliminó completamente del producto el sarcosilo restante en el filtrado con las posteriores etapas de purificación (ejemplos 8 y 9).

55 Ejemplo 8: Precipitación de contaminantes a pH ácido

Mediante precipitación de ácido a pH 4,3-4,5, se eliminaron algunas impurezas fácilmente, mientras que el G-CSF permanece soluble. Cualquier coprecipitación no específica e indeseada potencial de G-CSF se evitó mediante la adición de urea 1 M en la concentración final. Se proporcionó urea mediante una disolución madre 6 M y se añadió lentamente al filtrado del ejemplo 6 con una velocidad de 1 dm³/min. Posteriormente, el pH se disminuyó añadiendo volumen 1/20 de acetato de sodio 1 M pH 4,8. Se redujo adicionalmente el pH hasta 4,3-4,5 mediante la titulación con ácido acético al 50%. La precipitación se permitió durante al menos una hora. Luego, se eliminó el material precipitado por filtración a través de un filtro de profundidad (doble capa Pall K700/KS50).

65 Ejemplo 9: Eliminación de sarcosilo residual e intercambio de tampón mediante cromatografías AEX + CEX conectadas en serie

Se usó tampón acetato de sodio 50 mM/pH 4,5 para equilibrio de 1) una columna de 4 dm³ rellena con resina de DEAE Macro-Prep (Bio-Rad, EE.UU.) AEX, y 2) una columna de 8 dm³ rellena con resina de Toyopearl SP-650C (Tosoh, Japón) CEX. Se conectaron ambas columnas directamente en un sistema de cromatografía de proceso ÅKTA (GE Healthcare, Suecia) en una disposición en tándem. Después del aclaramiento a través de un filtro estéril de 0,2 µm, se cargó el filtrado del ejemplo 7 en la primera columna. El sarcosilo residual se unió a la resina DEAE, mientras que G-CSF permaneció sin unir (modo no de unión) y apareció en el flujo a través de la primera columna. Este flujo a través se cargó directamente en la segunda columna (resina SP), que se unió a G-CSF (modo de unión). Una simple elución por etapas con Tris-HCl 20 mM/pH 8 desorbió el G-CSF de la resina. Además de la eliminación de sarcosilo residual, también se logró un intercambio de tampón de Na-acetato/pH 4,5 a Tris-HCl/pH 8 mediante este método.

Ejemplo 10: 2º replegamiento (finalización del plegamiento)

En esta fase, se completó el plegamiento de aproximadamente la mitad de la fracción de proteínas, mientras que la proteína restante se plegó o plegó incorrectamente de manera incompleta. La disolución de G-CSF eluyó de Toyopearl SP-650C en Tris-HCl 20 mM, pH 8 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,2 µm en un recipiente de acero inoxidable. La disolución filtrada se diluyó 2 veces con agua. La segunda incubación para el plegamiento de proteína (2º replegamiento) se llevó a cabo en un equipo de baja conductividad (< 1 mS/cm) a pH 8 con enfriamiento a 2-8°C durante 32-42 horas.

Ejemplo 11: Purificación mediante cromatografía AEX (etapa de pulido 1)

Se rellenó una columna con DEAE Macro-Prep (Bio-Rad, EE.UU.) y se equilibró con Tris-HCl 10 mM/pH8. La disolución que resultó del 2º replegamiento (ejemplo 9) se cargó a la columna DEAE. Se eluyó el G-CSF plegado correctamente mediante un gradiente de NaCl lineal creciente desde 0 mM hasta 200 mM en Tris-HCl 10 mM/pH 8. Se agrupó el G-CSF eluido y se diluyó 2 veces con agua. Se ajustó el pH hasta 4,5 mediante titulación con ácido acético al 50%.

Ejemplo 12: Purificación mediante cromatografía CEX (etapa de pulido 2)

Para la etapa de pulido final, la agrupación de G-CSF recogida de la cromatografía AEX (ejemplo 10) que consiste en proteína plegada correctamente se aplicó directamente en una columna CEX rellena con resina Toyopearl CM-650S. Se equilibró la columna mediante acetato de sodio 20 mM, pH 5,3. Se eluyó el G-CSF unido mediante un gradiente de sal lineal creciente de acetato de sodio desde 20 mM hasta 400 mM dentro de 24 volúmenes de columna a pH 5,3. Se recogieron fracciones con G-CSF puro y se agruparon para formulación.

Ejemplo 12b: Formulación de G-CSF purificado mediante cromatografía en gel

El G-CSF purificado tal como se eluyó de la columna CEX (ejemplo 11) se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm y se pasó a través de una columna de 14 dm³ rellena con resina fina Sephadex G-25 equilibrada con tampón de formulación (acetato de sodio 10 mM, pH 4, sorbitol al 5% y polisorbato 80 al 0,006%). El mismo tampón se usó como tampón de ejecución. El G-CSF se eluyó en el volumen vacío en el tampón de formulación. Para un lote completo (35-48 g de G-CSF) se realizaron tres ejecuciones posteriores de formulación en Sephadex G-25, cada una con un tercio del eluido de CEX filtrado. El G-CSF formulado se ajustó a una concentración de 0,9-1,0 mg/ml por dilución con tampón de formulación y finalmente se filtró a través de una cápsula de filtro estéril de 0,2 µm. El G-CSF formulado como disolución estéril es muy estable y puede almacenarse a 2-8° durante muchos meses o incluso años.

Ejemplo 13: Métodos analíticos

Se realizaron métodos analíticos convencionales bien conocidos de acuerdo con la Farmacopea Europea (Farm. Eur.), que contiene una monografía para filgrastim que describe métodos analíticos específicos (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM) (2010): Filgrastim concentrated solution. Farmacopea Europea 7.0, 2015-2018). Para técnicas básicas, la monografía hace referencias cruzadas a otros capítulos dentro de la Farmacopea Europea. Estos capítulos a los que se hace referencia específicamente, que proporcionan una descripción más detallada de las técnicas, se citan entre corchetes en los ejemplos a continuación. Los patrones de referencia utilizados o bien eran productos farmacológicos comercialmente autorizados adquiridos (filgrastim), aprobados por la Unión Europea para uso médico, o bien eran patrones internos que se calibraron usando estas referencias comerciales. Para el análisis de la potencia relativa en cuanto a unidades internacionales (UI), se usó además el patrón de G-CSF internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los métodos de prueba usados para analizar la pureza, las impurezas específicas, las proteínas relacionadas con G-CSF y la actividad biológica (potencia) se aplicaron según la monografía de la Farm. Eur. con únicamente unas pocas modificaciones. Por tanto, en lo siguiente, estos métodos analíticos convencionales, que se conocen en la técnica, sólo se describen resumidamente.

Ejemplo 13.1 – Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): [Farm. Eur. 7, 2.2.31]. Se usó SDS-PAGE para determinar el tamaño molecular, la identidad de G-CSF y la pureza. Los geles tenían PA al 12% e incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS). El método se usó en condiciones reductoras y no reductoras. Se tiñeron los geles con Sypro ruby. Para calcular las masas moleculares relativas (Mr) se usó un panel de proteínas marcadoras con masas definidas.

Ejemplo 13.2 - Cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (SEC-HPLC): [Farm. Eur. 7, 2.2.30]. Se usó SEC para detectar impurezas o sustancias relacionadas con G-CSF con masas moleculares mayores que la de Filgrastim (dímeros, agregados). La detección de las proteínas se basó en absorción UV. La pureza (pico principal) y las impurezas (dímeros, agregados) se expresaron en % de área de sustancia activa para cada componente. Los resultados de la prueba se calcularon a partir del promedio de mediciones replicadas. La figura 2 muestra un ejemplo de un cromatograma de SEC de un lote de G-CSF purificado (3B) en comparación con el patrón de referencia (3A). Las trazas de agregados son visibles a la izquierda del pico principal. El pico derecho desde el pico principal está provocado por el disolvente y no una impureza.

Ejemplo 13.3 - Cromatografía líquida a alta presión de fase inversa (RP-HPLC): [Farm. Eur. 7, 2.2.29]. Se utilizó RP-HPLC para determinar la identidad de G-CSF, para calcular el contenido en G-CSF y la pureza. También se usó el método para identificar y cuantificar sustancias relacionadas con el producto. La detección de las proteínas se basó en absorción UV. Las impurezas de proteínas relacionadas se expresaron en porcentaje de sustancia activa (% de área). Se calcularon los resultados de prueba a partir del promedio de mediciones replicadas.

Ejemplo 13.4 – Electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico (IEF): [Farm. Eur. 7, 2.2.54]. Se usó este método para detectar impurezas o sustancias relacionadas con el producto con cargas que difieren de G-CSF (por ejemplo, G-CSF desamidado). Se llevó a cabo separación en geles de poliacrilamida que contienen gradientes de pH inmovilizados basados en anfólitos. Además, se calculó el punto isoeléctrico (pI) de cada banda de proteína usando un conjunto de proteínas marcadoras que tienen pI definidos.

Ejemplo 13.5 – Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): Se usó este método para determinación cuantitativa de niveles de proteína de célula huésped de *E. coli* (HCP). Se realizó la prueba usando un kit de ensayo inmunoenzimático adquirido comercialmente (genérico) (Cygnum Technologies, n.º F410). Se recubrió la fase sólida de tiras de microtitulación con anticuerpos anti-*E. coli* policlonales purificados por afinidad que capturaron HCP de las muestras de prueba. Un anticuerpo anti-*E. coli* trazador marcado con peroxidasa del rábano (HRP) se unió simultáneamente a HCP y el sándwich resultante soportó procedimientos de lavado. Se detectó HCP unido, respectivamente HRP, mediante oxidación del sustrato tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno. Se midió la densidad óptica mediante un lector de ELISA. Se realizó la cuantificación con un gráfico de calibración obteniendo calibradores de HCP (proporcionados por el kit) en diferentes concentraciones. El método se realizó exactamente según las instrucciones del proveedor. Se expresaron concentraciones de HCP en ng/ml o ng/mg (ppm).

Ejemplo 13.6 – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR): Se usa este ensayo para la determinación de ADN de célula huésped de *E. coli*. Se aplicó un kit disponible comercialmente designado “resDNASEQ™ *E. coli* Residual DAN Quantification System” que se basa en la tecnología de qPCR TaqMan® en tiempo real (Applied Biosystems). El método es muy sensible y específico en detección de contaminación de ADN. El ensayo se basa en amplificación específica de secuencia y detección de fluorescencia en tiempo real de fragmentos de ADN bien definidos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos de la secuencia (SSP) y sondas de hibridación marcadas de manera fluorescente (TaqMan®). Todo el método, incluyendo instrumentación, reactivos, muestreo y cálculo basado en software, se realizó según las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 13.7 – Endotoxinas bacterianas: [Farm. Eur. 7, 2.6.14, método C]. La detección de endotoxinas bacterianas gram-negativas son métodos convencionales armonizados globalmente basados en lisados de amebocitos de cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*). Esta prueba de *Limulus* (“prueba de LAL”) se llevó a cabo usando la técnica cinética turbidimétrica (método C) según la Farmacopea Europea. Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI) en relación con el patrón de endotoxinas internacional BRP.

Ejemplo 13.8 – Ensayo para determinar la actividad biológica (potencia relativa): Se sometió a prueba la actividad biológica de muestras de G-CSF en un ensayo de proliferación *in vitro* basado en células tal como se describe en la monografía de filgrastim con las siguientes modificaciones. El método de bioensayo se basó en la comparación del cambio de la proliferación celular de células NFS-60, que se originaron de una línea de células mieloblásticas murinas. Se trataron las células NFS-60 con series de dilución de la muestra de prueba y la disolución de referencia en paralelo. La proliferación de las células NFS-60 puede estimularse significativa y específicamente con G-CSF. Se realizó propagación de las células en placas de microtitulación durante 72 horas. Se detectó el efecto proliferativo usando el sustrato resazurina (alamar®Blue) que se convirtió mediante células viables en el colorante de fluorescencia resorufina. La señal de fluorescencia era detectable con alta sensibilidad. Se usó el cálculo de ensayo de líneas paralelas de las curvas de respuesta a la dosis, con al menos tres puntos en la parte lineal de las curvas, como evaluación estadística. El intervalo de aceptación estaba entre el 80% y el 125% en comparación con la disolución de referencia. La potencia relativa se expresó en unidades internacionales (UI) que se definieron

mediante patrones internos calibrados según el patrón de la OMS internacional para filgrastim. El G-CSF humano puro, totalmente activo posee una actividad biológica específica de $1,0 \times 10^8$ UI/mg.

5 Ejemplo 13.9 – Mapeo peptídico: [Farm. Eur. 7, 2.2.55]. Se usó el mapeo peptídico seguido por análisis de espectroscopía de masas (EM) para el análisis de los puentes disulfuro. La escisión enzimática del procedimiento de enlaces peptídicos se desarrolló basándose en la monografía de la Farm. Eur. para filgrastim. La proteasa usada para escisión era glutamil endopeptidasa (EndoGlu-C). Se llevó a cabo incubación a 37°C durante 24 horas y se detuvo mediante la adición de GuHCl 8 M y ebullición. Se realizó el procedimiento de mapeo peptídico en 10 condiciones reductoras y no reductoras. Las diferencias resultantes en el espectro de EM de los perfiles peptídicos para condiciones reductoras y no reductoras demuestra la posición de los enlaces disulfuro. G-CSF (filgrastim) intacto completamente plegado tiene dos puentes disulfuro en las posiciones Cys37-Cys43 y Cys65-Cys75, mientras que un residuo de cisteína está libre en la posición 18.

15 Alternativamente, pueden separarse péptidos obtenidos de muestras de G-CSF tras la digestión proteolítica en un sistema de RP-HPLC y detectarse en UV. Este método proporciona datos comparativos, ya que el cromatograma similar a huella dactilar obtenido con la disolución de prueba se compara con el cromatograma obtenido con el material de referencia.

20 Lista de referencias

- 25 1. R. R. Burgess, 1996 "Purification of over produced E. coli RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl". *Methods Enzymol.* 273, 145-149
- 30 2. David C. Dale, 2002 "Colony-Stimulating Factors for the Management of Neutropenia in Cancer Patients", *Aids International Limited Drugs 2002*; 62 supl. 1, 1-15
- 35 3. P.E. Devlin, 1988, "Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows processing by methionine aminopeptidase in *Escherichia coli*", Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) *Gene*, 65, 13-22
- 40 4. Arndt Dietrich *et al.*, enero de 2003 "Industrial Protein Folding", www.gitverlag.com/go/bioint BIOforum Europe, 1-3
- 45 5. Farmacopea Europea, julio de 2010 "Filgrastim concentrated solution"; 2015-2018
- 50 6. Elanders Österval, abril de 2007 "Purification and renaturation of recombinant proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies, www.gelifesciences.com/protein-purifaction Application note 18-1112-33 AC, 1-4
- 55 7. Glover, D.M. *DNA Cloning Volume I: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1985.
- 60 8. M. Heidari *et al.*, mayo de 2001, "Expression, purification, and in vitro biological activities of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor", www.elsevier.com/locate/vetimm *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81, 45-57
- 65 9. Holloway C.J, 1994, "Applications of Recombinant DNA Technology in the Production of Glycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor", *European Journal of Cancer* vol. 30 A, supl. 3, S2-S6
10. Soo-Hyung Kang *et al.*, julio de 1995, "High Level Expression and Simple Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in *E. coli*", *Biotechnology Letters* volumen 17 n.º 7 687-692
11. Khalilzadeh R. *et al.*, julio de 2008, "Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*", *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 1643-1650
12. Fiona A. O. Marston, 1986, "The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*", *Biochem. J.* (1986) vol. 240, 1-12
13. G. Molineux, 2004, "The Design and Development of Pegfilgrastim", *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 1235-1244
14. Dasari Venkata Krishna Rao *et al.*, 2008, "A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli* and its characterization, *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2008) 50, 77-87
15. Harald Tschesche, 1990, "Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research", Walter de Gruyter, Berlín, NY, 149-171
16. Rainer Rudolph *et al.*, enero de 1996, "In vitro folding on inclusion body proteins", *The FASEB Journal* vol. 10,

49-56

17. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989)
18. Ana LS Vanz *et al.*, abril de 2008, "Human granulocyte colony stimulating factor 8hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization", *Microbial Cell Factories* 2008, www.microbialcellfactories.com/content/7/1/13, 1-12
19. Chao Zhan WANG *et al.*, 2005, "Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor from *Escherichia coli*", *Chinese Chemical Letters* vol. 16 n.º 3 www.imm.ac.cn/journal/ccl.html, 389-392
20. Karl Welte *et al.*, septiembre de 1996, "blood", *Blood* Vol. 88 n.º 8, American Society of Hematology www.bloodjournal.org, 1907-1929
21. Paul WINGFIELD *et al.*, 1988, "Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)", *Biochem. J.* Vol. 256, 213-218
22. Krisztina M. Zsebo *et al.*, 1986, "Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor: Molecular and Biological Characterization", *Immunobiol.*, Vol. 173, 175-184
23. Lu et al, 1992, *The Journal of biological Chemistry*, vol 267:8770-8777
24. Documento WO 03/051922 A1
25. Documento WO 01/87925 A2
26. Documento WO 01/04154 A1
276. Documento WO 00/02901
28. Documento US 6.489.450 B2
29. Documento US 5.849.883
30. Documento US 5.681.720
29. Documento US 5.055.555
31. Documento EP 1 837 346 A2
32. Documento EP 1 630 173 A2
33. Documento EP 0 219 874 A2
34. Documento WO 2010/146599 A1
35. Documento WO 2008/096370 A3
36. Documento WO 2006/135176 A1
37. Documento WO 2006/097944 A2
38. Documento WO 2004/015124 A1
39. Documento WO 2004/001056 A1
40. Documento WO 98/53072
41. Documento WO 89/10932
42. Documento WO 87/01132

65

Lista de secuencias

<110> Richter Gedeon Nyrt.

<120> Método para la producción de polipéptidos

5 <130> HE 162 843

<150> HU P1200171

<151> 19-03-2012

10 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 174

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

20

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170

<210> 2
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln
 20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met
 35 40 45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Arg Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
 85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
 100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro
 115 120 125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
 130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
 165 170

10

<210> 3
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
 115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 175

<210> 4
 <211> 5234
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del vector de G-CSF

10 <400> 4

caattccttag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tadcaggatt 60
 atcaatacca tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca 120
 gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat 180
 acaacctatt aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt 240
 gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag tttatgcatt tctttccaga cttgttcaac 300
 aggccagcca ttacgctcgt catcaaaatc actcgcacat accaaaccgt tattcattcg 360

tgattgcgcc tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat taaaaacagg 420
 aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt cacctgaatc 480
 aggatattct tctaatacct ggaatgctgt tttcccgggg atcgcagtgg tgagtaacca 540
 tgcacatca ggagtacgga taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa attccgtcag 600
 ccagtttagt ctgaccatct catctgtaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt 660
 cagaaacaac tctggcgcat cgggcttccc atacaatcga tagattgtcg cacctgattg 720
 cccgacatta tcgcgagccc atttataccc atataaatca gcatccatgt tggaatttaa 780
 tcgcggccta gagcaagacg tttcccgttg aatatggctc ataacacccc ttgtattact 840
 gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt 900
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc 960
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 1020
 cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 1080
 caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 1140
 cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 1200
 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 1260
 gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 1320
 acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 1380
 atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 1440
 cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 1500
 gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 1560
 tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 1620
 tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 1680
 agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta 1740
 cgcacatctg cggtatttca caccgcaatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 1800
 cgcacatgta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 1860
 cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcacccgct 1920
 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca 1980
 ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2040
 atgtctgcct gttcatccgc gtcacgctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2100
 cttctgataa agcgggcat gtttaagggcg gttttttcct gtttggtcac tgatgcctcc 2160
 gtgtaagggg gatttctgtt catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc 2220
 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaaaa 2280

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ctggcggtat | ggatgcggcg | ggaccagaga | aaaatcactc | agggtcaatg | ccagcgcttc | 2340 |
| gttaatacag | atgtaggtgt | tccacagggt | agccagcagc | atcctgcgat | gcagatccgg | 2400 |
| aacataatgg | tgcagggcgc | tgacttccgc | gtttccagac | tttacgaaac | acggaaaccg | 2460 |
| aagaccattc | atgttgttgc | tcaggctgca | gacgttttgc | agcagcagtc | gcttcacgtt | 2520 |
| cgctcgcgta | tcggtgattc | attctgctaa | ccagtaaggc | aaccccccca | gcctagccgg | 2580 |
| gtcctcaacg | acaggagcac | gatcatgcgc | acccgtaggg | ccgccatgcc | ggcgataatg | 2640 |
| gcctgcttct | cgccgaaacg | tttggtggcg | ggaccagtga | cgaaggcttg | agcgagggcg | 2700 |
| tgcaagattc | cgaataccgc | aagcgacagc | ccgatcatcg | tcgcgctcca | gcgaaagcgg | 2760 |
| tcctcgccga | aatgaccca | gagcgctgcc | ggcacctgtc | ctacgagttg | catgataaag | 2820 |
| aagacagtca | taagtgcggc | gacgatagtc | atgccccgcg | cccaccggaa | ggagctgact | 2880 |
| gggttgaagg | ctctcaaggg | catcggtcga | gatcccgggtg | cctaatagagt | gagctaactt | 2940 |
| acattaattg | cgttgcgctc | actgcccgtc | ttccagtcgg | gaaacctgtc | gtgccagctg | 3000 |
| cattaatgaa | tcggccaacg | cgcggggaga | ggcggtttgc | gtattggggc | ccaggggtggt | 3060 |
| ttttcttttc | accagtgaga | cgggcaacag | ctgattgccc | ttcaccgcct | ggccctgaga | 3120 |
| gagttgcagc | aagcgggtcca | cgctggtttg | ccccagcagg | cgaaaatcct | gtttgatggt | 3180 |
| ggttaacggc | gggatataac | atgagctgtc | ttcggtatcg | tcgtatccca | ctaccgagat | 3240 |
| gtccgcacca | acgcgcagcc | cggactcggg | aatggcgcgc | attgcgcca | gcgccatctg | 3300 |
| atcgttggca | accagcatcg | cagtgggaac | gatgccctca | ttcagcattt | gcatggtttg | 3360 |
| ttgaaaaccg | gacatggcac | tccagtcgcc | ttcccgttcc | gctatcggct | gaatttgatt | 3420 |
| gcgagtgaga | tatttatgcc | agccagccag | acgcagacgc | gccgagacag | aacttaatgg | 3480 |
| gcccgcctaac | agcgcgattt | gctggtgacc | caatgcgacc | agatgctcca | cgcccagtcg | 3540 |
| cgtaccgtct | tcatgggaga | aaataaact | gttgatgggt | gtctggtcag | agacatcaag | 3600 |
| aaataacgcc | ggaacattag | tgcaggcagc | ttccacagca | atggcatcct | ggtcatccag | 3660 |
| cggatagtta | atgatcagcc | cactgacgcg | ttgcgcgaga | agattgtgca | ccgccgcttt | 3720 |
| acaggcttgc | acgcgccttc | gttctaccat | cgacaccacc | acgctggcac | ccagttgatc | 3780 |
| ggcgcgagat | ttaatcgccg | cgacaatttg | cgacggcgcg | tgcaaggcca | gactggaggt | 3840 |
| ggcaacgcc | atcagcaacg | actgtttgcc | cgccagttgt | tgtgccacgc | ggttgggaat | 3900 |
| gtaattcagc | tcgccatcg | ccgcttccac | tttttccgc | gttttcgcag | aaacgtggct | 3960 |
| ggcctggttc | accacgcggg | aaacggctctg | ataagagaca | ccggcatact | ctgcgacatc | 4020 |
| gtataacggt | actggtttca | cattcaccac | cctgaattga | ctctcttccg | ggcgcctatca | 4080 |
| tgccataccg | cgaaaggttt | tgcgccattc | gatggtgtcc | gggatctcga | cgctctccct | 4140 |

tatgcgactc ctgcattagg aagcagccca gtagtagggt gaggccggtg agcaccgccg 4200
 ccgcaaggaa tgggtgatgc aaggagatgg cgcccaacag tcccccggcc acgggggctg 4260
 ccaccatacc cacgccgaaa caagcgctca tgagcccgaa gtggcgagcc cgatcttccc 4320
 catcgggtgat gtcggcgata taggcgccag caaccgcacc tgtggcgccg gtgatgccgg 4380
 ccacgatgcg tccggcgtag aggatcgaga tcgatctcga tcccgcgaaa ttaatacgac 4440
 tcactatagg ggaattgtga gcgataaca attcccctct agaaataatt ttgtttaact 4500
 ttaagaagga gatatacata tgactccatt aggtcctgct tcttctctgc cgcaaagctt 4560
 tctgctgaaa tgtctggaac aggttcgtaa aatccagggt gacgggtgctg cactgcaaga 4620
 aaaactgtgc gctacttaca aactgtgcc a tccggaagag ctggtactgc tgggtcattc 4680
 tcttgggatc ccgtgggctc cgctgtcttc ttgtccatct caagctcttc agctggctgg 4740
 ttgtctgtct caactgcatt ctggtctggt cctgtatcag ggtcttctgc aagctctgga 4800
 aggtatctct ccggaactgg gtccgactct ggacactctg cagctagatg tagctgactt 4860
 tgctactact atttggcaac agatggaaga gctcggatg gcaccagctc tgcaaccgac 4920
 tcaagggtct atgccggcat tcgcttctgc attccagcgt cgtgcaggag gtgtactggt 4980
 tgcttctcat ctgcaatctt tcctggaagt atcttaccgt gttctgcgtc atctggctca 5040
 gccgtaataa gctcgagcac caccaccacc accaccacca ctaattgatt aatacctagg 5100
 ctgctaaaca aagccccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta 5160
 gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact 5220
 atatccggat ctag 5234

5 <210> 5
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia cebadora IntLambd 1
 <400> 5

gtccgactta tgcccagaaa gatgtgagc aaacttatcg cttatc 46

15 <210> 6
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia cebadora IntLambd 2
 <400> 6

25 tgcaaagaga ttctggcgg agaaaccata attgcatcta ctcg 44

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un polipéptido de G-CSF recombinante en cuerpos de inclusión, comprendiendo el método
 - (a) cultivar una célula huésped bacteriana a una primera temperatura entre 36°C y 38°C, comprendiendo la célula huésped un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante,
 - (b) reducir la temperatura de cultivo desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura entre 30°C y 35°C, y
 - (c) cultivar la célula huésped bacteriana a la segunda temperatura,
 en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor T7 inducible y en el que la reducción de la temperatura se realiza cuando el cultivo celular ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de entre 10 y 50, y en el que el cromosoma de la célula huésped bacteriana comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una ARN polimerasa de bacteriófago unida operativamente a un promotor lac.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el huésped bacteriano es E. coli.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera temperatura es de 37°C.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda temperatura está entre 31°C y 33°C.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH durante el cultivo a la primera temperatura y/o la segunda temperatura está entre 6 y 8.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH durante el cultivo a la primera temperatura y/o la segunda temperatura está entre 6,8 y 7,2.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reducción de la temperatura se realiza cuando el cultivo celular ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm de entre 27 y 33.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el G-CSF es G-CSF humano o bovino, opcionalmente con un residuo de aminoácido de metionina inicial en la posición -1, respectivamente.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando precedidas las etapas (a) a (c) por una etapa de introducción en una célula huésped bacteriana de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante, en el que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor inducible.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cromosoma de la célula huésped bacteriana comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para ARN polimerasa de bacteriófago, unida operativamente a un promotor lac, y está libre de secuencias de ácido nucleico de bacteriófago lisógeno, en el que opcionalmente la ARN polimerasa de bacteriófago es T7 polimerasa.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión del polipéptido de G-CSF se realiza mediante la adición de un inductor, en el que opcionalmente el inductor se añade simultáneamente con o posteriormente a la reducción de la temperatura, en el que opcionalmente el inductor es IPTG.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido de G-CSF recombinante se selecciona del grupo que consiste en
 - (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 1; y
 - (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia tal como se representa en SEQ ID NO: 3.

Tabla 1:
Rendimiento de G-CSF después de la solubilización

| Temperatura antes de la inducción | Temperatura en / después de la inducción | Rendimiento total de IB | Contenido en GCSF de IB | Rendimiento total de G-CSF solubilizado |
|-----------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|---|
| 37°C | 25°C | 180 g | 60% | 108 g |
| 37°C | 30°C | 410 g | 45% | 185 g |
| 37°C | 32°C | 650 g | 35% | 228 g |
| 37°C | 35°C | 830 g | 20% | 166 g |
| 37°C | 37°C | 950 g | 10% | 95 g |

Tabla 2:
Condiciones preferidas de las dos etapas de replegamiento

| Condición | 1 ^{er} replegamiento | 2 ^o replegamiento |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Pureza de G-CSF | 60-70% | 80-90% |
| Concentración de sarcosilo | 0,5% | 0 |
| Concentración de CuSO ₄ | 40 µM | 0 |
| Tris-HCl (pH 8) | 20 mM | 10 mM |
| Valor de pH | 8 | 8 |
| Temperatura | Temperatura ambiente | 2-8°C |
| Tiempo de incubación | 20-24 h | 32-42 h |

Tabla 3:
Rendimiento de tres lotes de producción de G-CSF

| Parámetro | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|
| Cuerpos de inclusión (masa húmeda) | 650 g | 650 g | 650 g |
| G-CSF purificado (tamaño de lote) | 48,5 g | 35,0 g | 34,5 g |
| Rendimiento (por masa húmeda de IB) | 7,5% | 5,4% | 5,3% |
| Pureza final (HPLC) | 97,5% | 96,9% | 97,0% |

Tabla 4:

Purificación de G-CSF: Seleccionado en controles de proceso (intervalo de tres lotes de producción)

| Etapa | Pureza (%) HPLC (pico principal) | Sarcosilo (mg/ml) | Endotoxina (UE/mg) |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------|
| 1 ^{er} replegamiento | 60,5 – 72,9 | 5,0 (#) | n.t. |
| AG 1X8 (método por lotes) | n.t. | 0,01 – 0,04 | n.t. |
| Precipitación de ácido | 77,6 – 90,0 | n.d. | 47,9 – 62,0 |
| 2 ^o replegamiento | 80,3 – 90,4 | n.t. | 2,6 – 60,5 |
| Pulido (DEAE → CM) | 96,5 – 97,4 | n.t. | n.d. |
| G-CSF formulado | 97,0 – 97,5 | n.d. | n.d. |

(#) valor calculado; n.d. = no detectable/por debajo del límite de detección; n.t. = no sometido a prueba

Tabla 5:

Pureza y actividad biológica de 3 lotes de producción de G-CSF

| Parámetro | Método de ensayo | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|--|---|-------------|--------|--------|
| Impurezas (total) | SDS-PAGE (reductor/no reductor) | n.d. | n.d. | n.d. |
| Impurezas (total) | IEF | n.d. | n.d. | n.d. |
| Impurezas relacionadas con el producto (total) | RP-HPLC | 2,5% | 1,6% | 3,1% |
| Impurezas relacionadas con el producto (agregados) | SEC-HPLC | 0,20% | 0,18% | 0,14% |
| Proteínas de célula huésped | ELISA | 2,7 ppm | n.d. | n.d. |
| ADN de célula huésped | qPCR | n.d. | n.d. | 5 ppm |
| Endotoxinas | Prueba de LAL | 0,288 UE/ml | n.d. | n.d. |
| Actividad biológica (potencia) | Ensayo de proliferación celular <i>in vitro</i> | 107% | 99% | 107% |

n.d. = no detectable/por debajo del límite de detección

Fig. 1A

“Vector de expresión de G-CSF”

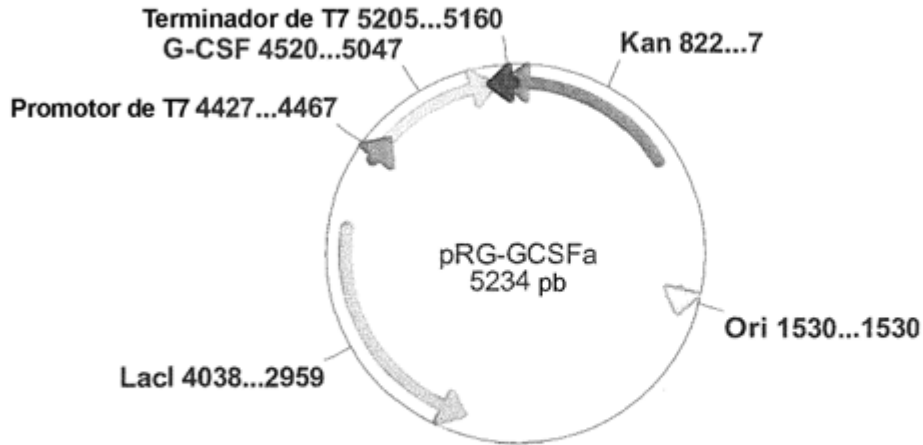


Fig. 1B

Seq.-ID 4: “Secuencia del vector de G-CSF”

```

CAATTCCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTA
TCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGT
TCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACA
ACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACG
ACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCC
AGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTG
CGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAA
TGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATT
CTTCTAATAACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATC
AGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGT
CTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAAC
CTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATC
GCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAG
CAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAG
ACAGTTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG
CTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAG
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGTTGGAC
    
```


TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
 AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGA
 AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGA
 ACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTG
 GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT
 ATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT
 CACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGT
 GAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
 GGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAAT
 GGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTA
 TCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
 GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTG
 CATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCA
 TCAGCGTGGTTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGA
 GTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTT
 TTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTCTGTTTCATGGGGGTAATGATA
 CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTAC
 TGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCAC
 TCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAG
 CATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGAC
 TTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCA
 GCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAA
 CCCCAGCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCG
 CCATGCCCGCGATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAA
 GGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCG
 CTCCAGCGAAAGCGGTCTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGA
 GTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCG
 GAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCCATAATGA
 GTGAGCTAACTTACATTAATGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
 CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCG
 CCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTG
 GCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGT
 TTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTA
 CCGAGATGTCGCGACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGC
 CATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATG
 GTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTT
 GATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAA
 TGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGT
 CGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGCTGGTCAGAGACATCAA
 GAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAG
 CGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTA
 CAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGG
 CGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGC
 AACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGGCCGCGAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAA
 TTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCT
 GGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA
 CGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATA
 CCGCGAAAGGTTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGAC
 TCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGA

ATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAACC
CACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCACATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTC
CGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGA
ATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA
TACATATGACTCCATTAGGTCCTGCTTCTTCTCTGCCGCAAAGCTTTCTGCTGAAATGTCT
GGAACAGGTTTCGTAAAATCCAGGGTGACGGTGCTGCACTGCAAGAAAACTGTGCGCTACT
TACAAACTGTGCCATCCGGAAGAGCTGGTACTGCTGGGTCATTCTCTTGGGATCCCGTGGG
CTCCGCTGTCTTCTTGTCCATCTCAAGCTCTTCAGCTGGCTGGTTGTCTGTCTCAACTGCA
TTCTGGTCTGTTCTGTATCAGGGTCTTCTGCAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGAAGT
GGTCCGACTCTGGACACTCTGCAGCTAGATGTAGCTGACTTTGCTACTACTATTTGGCAAC
AGATGGAAGAGCTCGGTATGGCACCAGCTCTGCAACCGACTCAAGGTGCTATGCCGGCATT
CGCTTCTGCATTCAGCGTCGTGCAGGAGGTGTACTGGTTGCTTCTCATCTGCAATCTTTC
CTGGAAGTATCTTACCGTGTCTGCGTCATCTGGCTCAGCCGTAATAAGCTCGAGCACCAC
CACCACCACCACCACCTAATTGATTAATACCTAGGCTGCTAAACAAAGCCCGAAAGGAA
GCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
GGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGATCTAG

Figura 2: Comparación de cromatogramas de SEC-HPLC a partir de un análisis de pureza de un producto farmacológico de filgrastim disponible comercialmente (3A) usado como referencia y el producto purificado según la presente invención (3B). Los detalles se describen en los ejemplos.

Fig 3A

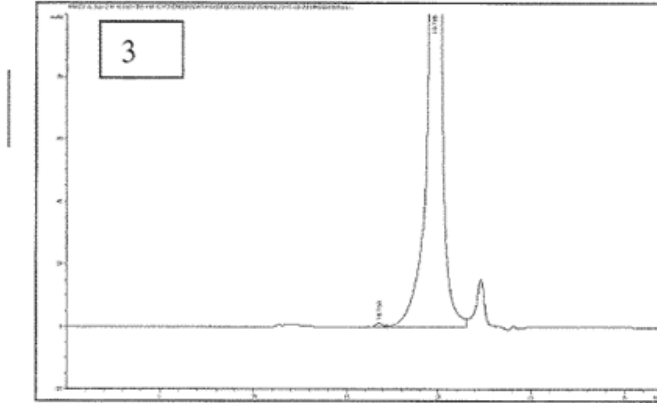


Fig 3B

