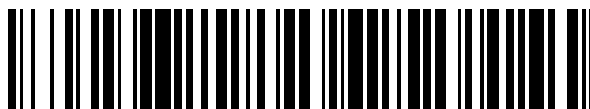


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 564**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2011** **PCT/BR2011/000320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012** **WO12034197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011** **E 11824375 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2617829**

54 Título: **Gen sintético para la expresión de SM-14 en Pichia pastoris, procedimientos de producción y purificación de SM-14 y su uso como vacuna y medio de diagnóstico**

30 Prioridad:

17.09.2010 BR 1005855

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

26.03.2020

73 Titular/es:

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (100.0%)
Avenida Brasil 4365, Manguinhos
21040-900, Rio de Janeiro, RJ, BR

72 Inventor/es:

TENDLER, MIRIAM;
RAMOS, CELSO RAUL ROMERO y
SIMPSON, ANDREW J G

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 750 564 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

Gen sintético para la expresión de SM-14 en *Pichia pastoris*, procedimientos de producción y purificación de SM-14 y su uso como vacuna y medio de diagnóstico

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la producción de proteínas recombinantes utilizando un gen sintético asociado con una alta expresión proteica en *Pichia pastoris*. Más específicamente, la presente invención describe la producción de la proteína recombinante Sm14 de *Schistosoma mansoni*. Se creó un gen sintético para promover la expresión alta de Sm14 y con este gen los inventores obtuvieron y modificaron una cepa de *Pichia pastoris* para la producción eficaz de una vacuna. Los inventores también mejoraron los procedimientos de producción y purificación proteica a partir de células de *P. pastoris*; la producción industrial de dichos procedimientos puede programarse.

Antecedentes

El peso molecular de la proteína Sm14 es aproximadamente de 14,8 kDa y es significativamente similar a las proteínas que pertenecen a la familia que se une a los ácidos grasos. Esto se ha estudiado y descrito ampliamente por el solicitante en sus previas solicitudes de patente.

La estructura tridimensional de la proteína Sm14 se predijo mediante modelado molecular por homología computarizada, así como por cristalografía y resonancia magnética nuclear. La estructura de la proteína Sm14 permitió identificar los epítomos potencialmente protectores e hizo posible utilizar la rSm14 como antígeno vacunal.

La estructura de Sm14, así como los modelos construidos por proteínas homólogas de *Fasciola hepatica* (FABP tipo 3, es la que comparte mayor identidad de secuencia, un 49 %), muestra que estas moléculas adoptan configuraciones tridimensionales que son similares a las moléculas de otras familias de proteínas que se unen a los lípidos (proteínas de unión a ácidos grasos- FABP).

Por lo tanto, basándose en los conocimientos completos del estado de la técnica reunidos por los inventores, demostrarán aquí cómo las formas recombinantes de Sm14 pueden proporcionar una protección significativa contra las infecciones causadas por helmintos supuestamente patógenos respecto a los seres humanos y los animales.

En las publicaciones que demuestran la actividad protectora de Sm14 por primera vez, se expresaba la proteína recombinante correspondiente con el vector pGEMEX-Sm14 como cuerpos de inclusión. Después de aislar y lavar los anticuerpos, se purificaba la proteína mediante electroforesis de preparación de la banda correspondiente (Tendler et al., A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 93, p. 269-273 1996) por electroelución. Sin embargo, esta metodología no era adecuada para la producción de proteínas a gran escala. Más tarde, la Sm14 se comenzó a producir con una fusión de seis histidinas consecutivas (6xHis) en el extremo amino del sistema de expresión de *Escherichia coli*, como cuerpos de inclusión. Después de obtener y solubilizar los cuerpos, era necesario volver a replegarla con el fin de obtener una proteína funcional e inmunológicamente activa (Ramos et al., r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 96 p. 131-135, 2001). Ramos et al., Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: structural and functional characterization of a vaccine candidate. El documento Biochim Biophys Acta. v. 1794, p. 655-662, 2009, se refiere a mutantes 62V de Sm14 que se utilizan en experimentos de desafío en animales. El documento de Varaldo et al (2006) FEMS Immunol Med Microbiol Vol. 48, páginas 132-139 describe la expresión de una Sm14 de *Schistosoma mansoni* con el codón optimizado para el bacilo de Calmette-Guerin de *Mycobacterium bovis*.

Por lo tanto, a pesar de todo el conocimiento reunido por los inventores aún hay desventajas que superar con el fin de que se pueda obtener material antigénico con altas prestaciones, a escala industrial y en condiciones GMP, y que no pierdan las características de estabilidad.

Sumario de la invención

La presente invención propone una plataforma para la producción de una vacuna recombinante contra helmintos en *Pichia pastoris*. Mediante la plataforma mencionada anteriormente es posible obtener una vacuna recombinante contra helmintos (en *P. pastoris*), incluyendo procedimientos de producción y purificación de Sm14 desarrollados en el sistema de *Pichia pastoris*.

La solicitud también desvela un gen sintético para la expresión de la proteína Sm14. La transformación genética de *Pichia pastoris* con este gen sintético bajo el control del promotor AOX1 permite la producción y purificación de Sm14.

Por lo tanto, la invención permite la obtención de Sm14 a partir de un gen sintético que contienen los codones optimizados para la alta expresión en *Pichia pastoris*, SEQ ID NO: 3 (secuencia final del gen), así como los procedimientos de purificación de Sm14. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producción de proteína recombinante Sm14 en *Pichia pastoris* que consiste en:

- (a) la síntesis de una secuencia de nucleótidos definida por SEQ ID NO: 3;
- (b) la clonación de la secuencia de nucleótidos sintetizada obtenida en la etapa (a) anterior en el vector pPIC9K mediante el sitio BamHI y la reconstitución de la secuencia Kozak del gen AOX1 antes del codón de inicio de la proteína Sm14, para la expresión de Sm14 en su forma intracelular; y
- (c) la transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9K-Sm14-MV y la selección de los clones recombinantes con múltiples copias.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de purificación de la proteína recombinante expresada en *Pichia pastoris* obtenida en un procedimiento de producción de acuerdo con el procedimiento de producción inventivo anterior, consistiendo dicho proceso en las siguientes etapas:

- (a) llevar a cabo la lisis de las células de *P. pastoris*;
- (b) clarificar el lisado obtenido en la etapa (a);
- (c) cargar el lisado clarificado en una resina de intercambio aniónico y después de la carga de la proteína, se eluye la proteína mediante cambios de pH en la columna; y
- (d) separación de las proteínas contaminantes de la proteína recombinante por filtración en gel.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra la estrategia para la construcción del plásmido pPIC9K-Sm14-MV.
 La Figura 2 muestra la clonación del Sm14-MV en el pPIC9K.
 La Figura 3 muestra el análisis de PCR de los clones de *P. pastoris*.
 La Figura 4 muestra la inducción de la expresión de Sm14 en los clones de *P. pastoris* GS115/pPIC9K-Sm14-MV.
 La Figura 5 muestra la inducción de la expresión de Sm14 en *P. pastoris* GS115/pPIC9K-Sm14-MV.
 La Figura 6 muestra los resultados de la purificación de Sm14.
 La Figura 7 muestra los resultados del cromatograma de la filtración en gel de la proteína Sm14-MV producida en *P. pastoris*.
 La Figura 8 muestra un análisis de transferencia de Western de la proteína purificada de *P. pastoris*.
 La Figura 9 muestra el espectro del diámetro circular de la proteína Sm14 purificada de *P. pastoris*.

Descripción detallada de la invención

El fin principal de la presente invención es producir una vacuna recombinante contra helmintos. Este objetivo se puede conseguir produciendo proteínas recombinantes utilizando un gen sintético para la alta expresión proteica en *Pichia pastoris*. De acuerdo con la invención se creó un gen sintético para promover la expresión alta de Sm14 y con este gen los inventores obtuvieron una cepa de *Pichia pastoris* para la producción eficaz de una vacuna. La presente invención incluye también los procedimientos de producción y purificación de la proteína a partir de células de *P. pastoris*; dichos procedimientos se pueden programar para la producción industrial.

El sistema de expresión en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* tiene ventajas significativas cuando se compara con los sistemas basados en *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes a escala industrial. Entre dichas ventajas se pueden mencionar, por ejemplo, la estabilidad de las cepas transformadas, la alta expresión, el cultivo de alta densidad, la programación fácil del cultivo, no hay peligro para la salud humana, y no produce endotoxinas (Faber et al., Review: Methylotrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. Yeast, v. 11, p. 1331-1344, 1995). La última ventaja es uno de los factores que tienen influencia en el cambio de microorganismos para la expresión proteica. Esto es debido a que la necesidad de detectar o cuantificar endotoxinas producidas por bacterias gramnegativas en cada lote sería un factor limitante, ya que los productos generados en *E. coli* que se utilicen posteriormente en seres humanos tienen que estar libres de endotoxinas bacterianas. Este requisito adicional dificultaría los procedimientos de producción en *E. coli* y esto tendría un impacto negativo en los costes de producción finales.

La invención se describirá ahora mediante su mejor procedimiento de ejecución.

1. OBTENCIÓN DE LA CEPA RECOMBINANTE DE *Pichia pastoris*

1.1 Gen sintético para la expresión de Sm14 en *P. pastoris*:

Primero se diseñó y sintetizó un gen que contenía los codones que estaban optimizados para obtener la máxima expresión de Sm14 en *P. pastoris*. En este caso los inventores utilizaron Sm14-MV; sin embargo, se puede utilizar cualquier forma de Sm14.

Hay pruebas en la bibliografía sobre el uso diferencial de codones entre proteínas con bajos y altos niveles de expresión en el mismo organismo (Roymondal y Sahoo, Predicting gene expression level from relative codon usage bias: an application *Escherichia coli* genome. DNA Res. v. 16, p. 13-30, 2009).

Sin embargo, las tablas de utilización del codón en las bases de datos (por ejemplo, en: (www.kazusa.or.jp/codon) contienen datos de todas las proteínas del cuerpo y no tienen en cuenta el nivel de expresión genética. Por esta razón, con el fin de diseñar el gen, los inventores inicialmente perfilaron una tabla de uso del codón basándose en los datos de las secuencias que codifican proteínas recombinantes que se expresaban por encima de 1 gramo por litro de cultivo en *P. pastoris* (véase la Tabla 1), así como la secuencia para la proteína AOX1 (que representa el 30 % de la proteína de *P. pastoris*, después de la inducción con metanol).

Tabla 1: Lista de proteínas recombinantes con alta expresión en *P. pastoris*.

Proteína expresada	(mg/l)	Referencia
Hidroxinitrilo liasa	22000	Hasslachner, M. et al. (1997) Protein Expr. Purif. 11: 61-71
Gelatina de ratón	14800	Werten, M.W. et al. (1999) Yeast 15: 1087-1096
Fragmento C de toxina tetánica	12000	Clare, J.J. et al. (1991) Bio/Technology 9: 455-460
Factor de necrosis tumoral humano	10000	Sreekrishna, K. et al. (1989) Biochemistry 28: 4117-4125
α -amilasa	2500	Paifer, E. et al. (1994) Yeast 10: 1415-1419
T2A peroxidasa	2470	Thomas, L. et al. (1998) Can. J. Microbiol. 44: 364-372
Catalasa L	2300	Calera, J.A. et al. (1997) Infect. Immun. 65: 4718-4724
Hirudina	1500	Rosenfeld, S.A. et al. (1996) Protein Expr. Purif. 8: 476-482.

Para el diseño de la secuencia los inventores escogieron la secuencia de la proteína Sm14-MV que tiene un resto de valina en la posición 62 sustituyendo una cisteína, que la hace más estables (Ramos et al., 2009); se representa aquí como SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

MSSFLGKWKLSSEHNFDVAMSKLGVSWATRQIGNTVTPTVTFTMDGDKMT
MLTESTFKNL SVTFKFGEEF DEKTS DGRNV KSVVEKNSES KLTQTQVDPK
NTTVIVREVD GDTMKTTVTVDVTAIRNYK RLS

Después de la primera selección de codones de acuerdo con la tabla perfilada con los datos de proteínas de la Tabla 1, los inventores llevaron a cabo las depuraciones de secuencia lo que resultó en los sitios donantes de terminación de la transcripción (ATTTA) y los receptores crípticos de corte y empalme (MAGGTRAGT y YYYNTAGC, respectivamente) y las secuencias repetitivas (sitios de escisión para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI). La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia diseñada para expresar la proteína Sm14-MV en *Pichia pastoris*.

SEQ ID NO: 2

1 ATGCTCTTCTT TCTTGGGTAA GTGGAAGTTG TCTGAATCTC ACAACTTCGA
 51 CGCTGTTATG TCTAAGTTGG GTGTTTCTTG GGCTACCAGA CAAATTGGTA
 101 ACACCGTTAC TCCAACCGTT ACCTTCACCA TGGACGGTGA CAAGATGACT
 151 ATGTTGACCG AGTCTACCTT CAAGAAGTTG TCTGTTACTT TCAAGTTCCG
 5 201 TGAAGAGTTC GACGAAAAGA CTTCTGACGG TAGAAACGTT AAGTCTGTTG
 251 TTGAAAAGAA CTCTGAATCT AAGTTGACTC AACTCAAGT TGACCCAAAG
 301 AACACTACCG TTATCGTTAG AGAAGTTGAC GGTGACACTA TGAAGACTAC
 351 TGTTACCGTT GGTGACGTTA CCGCTATCAG AACTACAAG AGATTGTCTT
 401 AA

Los inventores añadieron la secuencia Kozak del gen de la proteína AOX1 de *P. pastoris* (AAACG) al extremo 5' de la secuencia diseñada. Finalmente, los inventores añadieron los sitios de restricción para BamHI (GGATCC) y EcoRI (GAATTC) a los extremos 5' y 3' del gen diseñado, respectivamente.

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia final del gen sintético para la producción de la proteína Sm14.

SEQ ID NO: 3

1 GGATCCAAAC GATGTCTTCT TTCTTGGGTA AGTGGAAGTT GTCTGAATCT
 51 CACAACTTCG ACGCTGTTAT GTCTAAGTTG GGTGTTTCTT GGGCTACCAG
 101 ACAAAATTGGT AACACCGTTA CTCCAACCGT TACCTTCACC ATGGACGGTG
 151 ACAAGATGAC TATGTTGACC GAGTCTACCT TCAAGAAGTT GTCTGTTACT
 201 TTCAAGTTTCG GTGAAGAGTT CGACGAAAAG ACTTCTGACG GTAGAAACGT
 251 TAAGTCTGTT GTTGAAGAAGA ACTCTGAATC TAAGTTGACT CAACTCAAG
 25 301 TTGACCCAAA GAACACTACC GTTATCGTTA GAGAAGTTGA CCGTGACACT
 351 ATGAAGACTA CTGTTACCGT TGGTGACGTT ACCGCTATCA GAACTACAA
 401 GAGATTGTCT TAAGAATTC

Después de sintetizar la secuencia diseñada (SEQ ID NO: 3), los inventores llevaron a cabo la clonación y después la secuenciación del gen sintético en el vector pCR2.1 para confirmar que la secuencia sintetizada era fiel a la secuencia diseñada.

1.2 Construcción del plásmido para la expresión de Sm14 en *Pichia pastoris*:

El gen sintetizado se clonó en el vector pPIC9K donde la proteína Sm14 se expresa sin ninguna fusión, haciendo posible su producción intracelular.

El vector pPIC9K (Invitrogen) se escogió para la construcción del plásmido de expresión de Sm14 en *P. pastoris* por las siguientes razones:

(1) Se puede utilizar para expresar proteínas intracelulares sustituyendo el gen del factor alfa con el gen de elección, mediante el sitio de restricción BamHI del vector, localizado antes de la secuencia Kozak y el inicio de la traducción. Con el fin de hacer esto, era necesario recrear la secuencia Kozak antes de que se expresara el ATG de la ORF, de acuerdo con el diseño del gen sintético de la Sm14.

(2) Ofrece la ventaja de permitir una selección de clones con múltiples copias integradas en el genoma seleccionando la resistencia al antibiótico G418. No había dicha posibilidad con el pPIC9 utilizado anteriormente.

La estrategia de la construcción del plásmido pPIC9K-Sm14 se describe en la Figura 1.

Con el plásmido pCR21-Sm14-MV, los inventores cambiaron la cepa DH5 α de *E. coli* para su propagación. Después se purificó el pADN con el kit Miniprep Spin Qiaprep (QIAGEN). El plásmido, así como el vector pPIC9K, se digirieron simultáneamente con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (ambas de New England Biolabs). Después de la digestión, los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. Los fragmentos correspondientes al vector pPIC9K y a la inserción Sm14-MV se escindieron del gel de agarosa y se purificaron con un kit de Extracción en Gel QIAquick (QIAGEN).

Los fragmentos purificados se unieron utilizando una ADN ligasa T4 (New England Biolabs). La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con la reacción de unión y se seleccionaron los clones en medio LB agar que contenía ampicilina. El pADN de uno cuantos clones resistentes a la ampicilina se purificaron y se analizaron por restricción con las enzimas BamHI y EcoRI, como se muestra en la Figura 2. En la Figura 2 se muestran los resultados de la clonación de Sm14-MV en pPIC9K; los clones se seleccionaron como se muestra posteriormente:

M.- 1 Kb de ADN escalonado + phiX174/HaeIII

1.- pPIC9K/BamHI + EcoRI

2.- pCR21-Sm14-MV/BamHI + EcoRI

3 a 11.- Clones pPIC9K-Sm14-MV/ BamHI + EcoRI.

En la Figura 2 las flechas marcan la posición de inserción y el vector de clonación.

Los clones que presentaban bandas correspondientes a las inserciones se seleccionaron y secuenciaron con el cebador de AOX5 para confirmar la clonación satisfactoria y la fidelidad de la secuencia. Por lo tanto, la secuencia sintética para la expresión de Sm14 se mantuvo bajo el control del promotor fuerte de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), que está inducido por metanol (Cregg et al., Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. BioTechnolochy. v. 11, p. 905-910, 1993).

1.3 Transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9K-Sm14-MV y selección de los clones recombinantes con múltiples copias

Con el fin de producir la proteína, se transformó la cepa GS115 (*his4*) de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9K-Sm14-MV. Este último se purificó con el kit Maxiprep (Qiagen). El ADN plasmídico se digirió por separado con las enzimas BglII y SacI (New England Biolabs), utilizando 20 µg de ADN para cada reacción. Las reacciones de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas con los fragmentos de ADN que contenían el gen sintético de Sm14-MV se separaron del gel y se purificó el ADN.

Se prepararon las células competentes de la cepa GS115 por electroporación y se transformaron por separado con ADN purificado de las reacciones de restricción por BglII y SacI (10 µg de ADN por transformación). La digestión con la enzima BglII guía la recombinación del casete de expresión del gen de AOX1, en el genoma de *P. pastoris*, mientras que la digestión con SacI se puede integrar en otras regiones.

Después de la transformación, las células se dispersaron en medio RD (medio libre de histidina) que contenía: 1 M de sorbitol; un 2 % de dextrosa; un 1,34 % de YNB; 4 x 10⁻⁵ % de biotina; y un 0,005 % de cada aminoácido: L-glutamato, L-metionina, L-lisina, L-leucina y L-isoleucina para la selección de cepas transformadas mediante el marcador auxotrófico *his4*. Los clones que podían crecer en el medio libre de histidina se sometieron a una selección con el antibiótico G418 a concentraciones de: 0,5; 1; 2; y 4 mg/ml en un cultivo YPD (un 1 % de extracto de levadura, un 2 % de peptona; un 2 % de dextrosa) a 30 °C en placas de microcultivo. Solamente los clones transformados con el plásmido pPIC9K-Sm14-MV digeridos con la enzima SacI podían crecer con el G418 a 4 mg/ml; esto caracterizaba la inserción de múltiples copias del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*.

Con el fin de confirmar si los clones seleccionados tenían el casete de expresión del gen sintético, se purificó el ADN genómico de 17 clones y se utilizó en reacciones de PCR con cebadores AOX5 y AOX3'. Se utilizó el plásmido pPIC9K-Sm14-MV como control positivo. La Figura 3 muestra el análisis de PCR de los clones de *P. pastoris* GS115 transformados con el pPIC9K-Sm14-MV y seleccionados con 4 mg/ml de G418.

M. - phiX174/HaeIII

1 a 17. - Clones GS115/pPIC9K-Sm14-MV

18. - Control positivo: plásmido pPIC9K-Sm14-MV.

Como se muestra en la Figura 3, todos los clones seleccionados con 4 mg/ml de G418 presentaban la secuencia sintética de Sm14-MV.

Con el fin de ensayar la expresión de la proteína Sm14, los clones se cultivaron en medio BMG (medio tamponado de glicerol mínimo) que contenía: Un 1,34 % de YNB; un 0,04 % de biotina, 0,1 M de fosfato potásico pH 6,0; y un 1 % de glicerol) durante 48 horas y luego se transfirieron a un medio BMM (medio tamponado de metanol mínimo, que contenía los mismos componentes que el medio BMG, excepto que el glicerol se sustituyó con un 0,5 % de metanol y EDTA adicional para una concentración final de 1 mM), para la inducción de la expresión de la proteína recombinante. Después de 72 horas, se añadió un 0,5 % de metanol cada 24 horas, y se analizaron las proteínas totales de cada clon mediante SDS-PAGE (Figura 4). La Figura 4 muestra los resultados de la inducción de la expresión de Sm14 en los clones de *P. pastoris* GS115/pPIC9K-Sm14-MV.

M.- marcador de bajo peso molecular

1. - Control positivo, proteína Sm14 de *E. coli* purificada sin fusionar

2 a 18 - Proteína total de los clones 1-17 GS115/pPIC9K-Sm14-MV después de la inducción con metanol.

1.4 Inducción de la expresión de Sm14 recombinante en *P. pastoris* GS115/pPIC9K-Sm14-MV

La Figura 5 muestra la inducción de la expresión de Sm14 en *P. pastoris* GS115/pPIC9K-Sm14-MV, donde:

M.- Marcador de bajo peso molecular

1.- Muestra no inducida en medio BMG

2 a 7.- Inducción de la expresión durante 0, 24, 48, 72 y 91 horas, respectivamente, en medio BMM

8.- Control positivo, proteína Sm14 de *E. coli* purificada sin fusionar

Era posible observar una banda mayoritaria en todos los clones seleccionados que coincidía con el tamaño de la proteína Sm14 de *E. coli* purificada sin fusionar.

Con el fin de confirmar si la proteína se inducía por el metanol, el clon nº 1 cultivado en un medio BMG durante 48 horas (Figura 5, carril 1) a 250 rpm, a 30 °C; se transfirió más tarde a un medio BMM (con un 0,5 % de metanol). Los inventores recolectaron muestras en diferentes intervalos de tiempo (Figura 5, carriles 2 a 7). Se añadió metanol al cultivo cada 24 horas, para alcanzar una concentración final del 0,5 %.

Como se muestra en la Figura 5, en el medio BMG los inventores no obtuvieron expresión proteica inducida por metanol (Figura 5, carril 1), y tampoco en el momento cero del medio de inducción BMM (Figura 5, carril 2). La inducción era visible tras las 24 horas de cultivo en medio BMM y se mantenía estable durante el cultivo celular, hasta las 91 horas que era el marco temporal del experimento.

Por lo tanto, los inventores han verificado la inducción específica de proteína recombinante correspondiente a Sm14 en *P. pastoris*.

En el experimento, utilizando solo el medio BMM y el metanol al 0,5 %, era posible alcanzar 26 gramos de peso celular húmedo por litro de cultivo, manteniendo un buen nivel de expresión de proteína Sm14, que es la proteína principal de las células después de la inducción con metanol. Además de utilizar un fermentador y medios más adecuados para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, es posible obtener tanto una mayor masa celular como una mayor expresión de Sm14.

2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA SM14 RECOMBINANTE EXPRESADA EN LA CEPA GS115/pPIC9K-Sm14-MV DE *P. pastoris*

El protocolo de purificación para la Sm14 recombinante del citoplasma de *P. pastoris* se basaba en la metodología desarrollada en el Laboratorio de Esquistosomiasis experimental del Instituto Oswaldo Cruz (IOC) para la purificación de Sm14 sin fusión en el sistema de *E. coli*.

Lisis: La purificación de las proteínas recombinantes comienza con la lisis de las células de *P. pastoris*. En este punto, las células se resuspendieron en 30 mM de Tris-HCl 3,0 mM pH 9,5 y se lisaron en una prensa de French. El lisado se clarificó por centrifugación (Figura 6, carril 2).

Captura: El lisado clarificado se cargó en una resina Q-Sepharose XL (GE Healthcare), se equilibró con tampón A (30 mM de Tris-HCl pH 9,5). Toda la proteína Sm14 del lisado se absorbe por la resina, ya que no había proteína Sm14 en el material que no se absorbiera en la resina (Figura 6, carril 3). Después de cargarse la proteína, se lavó la columna con el tampón a. La proteína se eluyó con el tampón B (30 mM de Tris-HCl pH 8,0) en el sistema AKTA-fplc (GE Healthcare) (Figura 6, carriles 4-6).

Acabado: La proteína eluida de la resina Q-sepharose XL presenta pocas proteínas contaminantes. Con el fin de separar estas proteínas de la Sm14 los inventores utilizaron filtración en gel. Para llevarlo a cabo, se reunieron las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico que contenían Sm14 y se concentraron en una membrana Centriprep YM-10 (Millipore) y el material se aplicó en una columna Sephacryl S100 HR 26/60 (GE Healthcare) utilizando PBS a pH 7,4 como fase móvil. El pico cromatográfico (Figura 6, carril 8) presentaba el mismo volumen de retención que las proteínas sin fusionar producidas en *E. coli* (Figura 7).

La Figura 6 muestra los resultados de la purificación de Sm14, donde

M.- marcador de bajo peso molecular

1.- Control positivo, proteína Sm14 de *E. coli* purificada sin fusionar

2.- lisado clarificado, 2.- Proteínas no absorbidas en la resina Q-sepharose XL

3-6.- Fracciones eluidas de la resina Q-sepharose XL

7.- Agrupamiento de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico

8.- Pico de la filtración en gel en la columna sephacryl S-100 HR 26/60

La Figura 7 muestra los resultados del cromatograma de la proteína Sm14-MV producida en *P. pastoris*.

4 - ANÁLISIS DE Sm14 RECOMBINANTE PRODUCIDA EN *Pichia pastoris*

La proteína recombinante de *P. pastoris* se purificó utilizando las mismas características fisicoquímicas que las de la proteína Sm14-MV sin fusionar expresada en *E. coli*. La proteína purificada de esta forma de *P. pastoris* se corresponde en tamaño con la proteína inducida específicamente por el metanol. Como los inventores tienen el gen sintético de Sm14-MV bajo el control del promotor AOX1 en el casete de expresión, dedujeron que la proteína expresada y purificada de *P. pastoris* es la Sm14-MV.

Con el fin de confirmar esta afirmación, se analizó la proteína purificada de *P. pastoris* mediante transferencia de

Western, utilizando un suero anti-Sm14 de conejo (Figura 8). La Figura 8 representa el análisis de transferencia de Western de la proteína purificada de *P. pastoris*.

1 y 2.- Proteína Sm14-MV purificada de *P. pastoris*

3.- Control positivo, proteína Sm14 de *E. coli* purificada sin fusionar

En este experimento se puede observar que los anticuerpos anti-Sm14 reconocen específicamente la proteína purificada de *P. pastoris* (el suero de conejo no reconoce las proteínas de *P. pastoris* endógenas, datos no mostrados), por lo tanto, se confirma su identidad.

Finalmente, era necesario identificar si la proteína purificada de *P. pastoris* tenía una estructura que se correspondiera con el plegamiento beta, que es típico de las proteínas de la familia de proteínas de unión a ácidos grasos, a la que pertenece la Sm14. Para hacerlo, se analizaron las muestras de proteínas mediante dicroísmo circular utilizando un fotopolarímetro espectral J-815 (JASCO) (Figura 9). La Figura 9 muestra el espectro del dicroísmo circular de la proteína Sm14 purificada de *P. pastoris*.

Como se puede ver en la Figura 9, el espectro se corresponde con una estructura beta de proteína. Este espectro era similar a los espectros de dicroísmo circular de muchas proteínas Sm14 de *E. coli* purificadas previamente en el laboratorio de Esquistosomiasis experimental.

Por lo tanto, basándose en el informe anterior se puede concluir que la presente invención permite:

diseñar y sintetizar un gen sintético para la alta expresión de Sm14-MV en *Pichia pastoris*;
construir un plásmido de expresión pPIC9K-Sm14-MV que contiene la secuencia genética sintética bajo el control del promotor AOX1;
obtener una cepa de *P. pastoris* que produzca Sm14 y;
purificar la Sm14 en dos etapas cromatográficas, cuya programación para la producción industrial es factible.

Por lo tanto, la invención descrita en el presente documento demuestra que la proteína Sm14 protege contra las infecciones causadas por *Schistosoma mansoni* en plataformas de *E. coli* y *P. pastoris*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundação Oswaldo Cruz e outros

<120> Gen sintético para la expresión de SM-14 en *Pichia pastoris*, métodos de producción y purificación de SM-14 y el uso de la misma como una vacuna y un medio de diagnóstico

<130> EP111301SZ298pau

<140> EP11824375.7

<141> 13-09-2011

<150> PCT/BR2011/000320

<151> 13-09-2011

<150> BRPI1005855-9

<151> 17-09-2010

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> *Schistosoma mansoni*

<400> 1

ES 2 750 564 T3

Met Ser Ser Phe Leu Gly Lys Trp Lys Leu Ser Glu Ser His Asn Phe
1 5 10 15

Asp Ala Val Met Ser Lys Leu Gly Val Ser Trp Ala Thr Arg Gln Ile
20 25 30

Gly Asn Thr Val Thr Pro Thr Val Thr Phe Thr Met Asp Gly Asp Lys
35 40 45

Met Thr Met Leu Thr Glu Ser Thr Phe Lys Asn Leu Ser Val Thr Phe
50 55 60

Lys Phe Gly Glu Glu Phe Asp Glu Lys Thr Ser Asp Gly Arg Asn Val
65 70 75 80

Lys Ser Val Val Glu Lys Asn Ser Glu Ser Lys Leu Thr Gln Thr Gln
85 90 95

Val Asp Pro Lys Asn Thr Thr Val Ile Val Arg Glu Val Asp Gly Asp
100 105 110

Thr Met Lys Thr Thr Val Thr Val Gly Asp Val Thr Ala Ile Arg Asn
115 120 125

Tyr Lys Arg Leu Ser

130

5 <210> 2
<211> 402
<212> ADN
<213> *Schistosoma mansoni*

10 <400> 2

atgtcttctt tcttgggttaa gtggaagttg tctgaatctc acaacttcga cgctgttatg 60
tctaagttgg gtgtttcttg ggctaccaga caaattggta acaccgttac tccaaccgtt 120
accttcacca tggacgggtga caagatgact atgttgaccg agtctacctt caagaacttg 180
tctgttactt tcaagttcgg tgaagagttc gacgaaaaga cttctgacgg tagaaacgtt 240
aagtctgttg ttgaaaagaa ctctgaatct aagttgactc aaactcaagt tgacccaaag 300
aacactaccg ttatcgttag agaagttgac ggtgacacta tgaagactac tgttaccgtt 360
ggtgacgtta ccgctatcag aaactacaag agattgtctt aa 402

15 <210> 3
<211> 419
<212> ADN
<213> *Schistosoma mansoni*

ES 2 750 564 T3

<400> 3

ggatccaaaac gatgtcttct ttcttgggta agtggaagtt gtctgaatct cacaacttcg	60
acgctgttat gtctaagttg ggtgtttctt gggctaccag acaaattggt aacaccgtta	120
ctccaacogt taccttcacc atggacgggtg acaagatgac tatgttgacc gagtctacct	180
tcaagaactt gtctgttact ttcaagttcg gtgaagagtt cgacgaaaag acttctgacg	240
gtagaaacgt taagtctgtt gttgaaaaga actctgaatc taagttgact caaactcaag	300
ttgacccaaa gaacactacc gttatcgta gagaagttga cggtgacact atgaagacta	360
ctgttacogt tggtgacgtt accgctatca gaaactacaa gagattgtct taagaattc	419

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de proteína Sm14 recombinante en *Pichia pastoris* que consiste en:

- 5 (a) la síntesis de una secuencia de nucleótidos definida por SEQ ID NO: 3;
(b) la clonación de la secuencia de nucleótidos sintetizada obtenida en la etapa (a) anterior en el vector pPIC9K mediante el sitio BamHI y la reconstitución de la secuencia Kozak del gen AOX1 antes del codón de inicio de la proteína Sm14, para la expresión de Sm14 en su forma intracelular; y
10 (c) la transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9K-Sm14-MV y la selección de los clones recombinantes con múltiples copias.

2. Un procedimiento de purificación de la proteína recombinante expresada en *Pichia pastoris* obtenida en un procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, consistiendo dicho proceso en las siguientes etapas:

- 15 (a) llevar a cabo la lisis de las células de *P. pastoris*;
(b) clarificar el lisado obtenido en la etapa (a);
(c) cargar el lisado clarificado en una resina de intercambio aniónico y después de la carga de la proteína, se eluye la proteína mediante cambios de pH en la columna; y
20 (d) separación de las proteínas contaminantes de la proteína recombinante por filtración en gel.

Figura 1

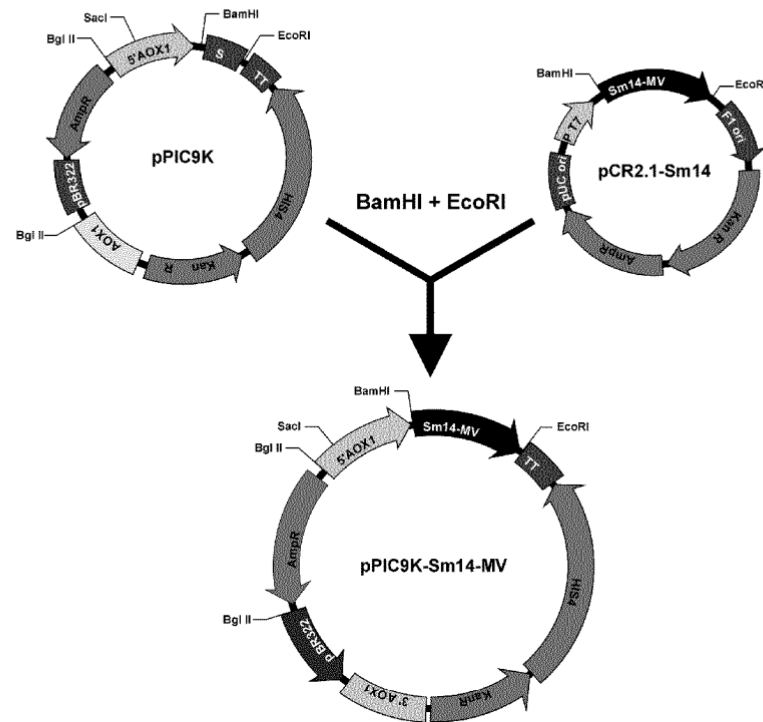


Figura 2

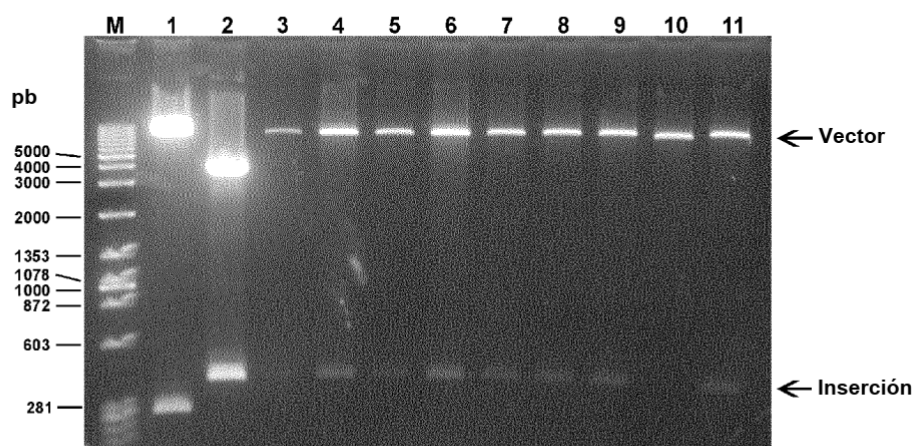


Figura 3

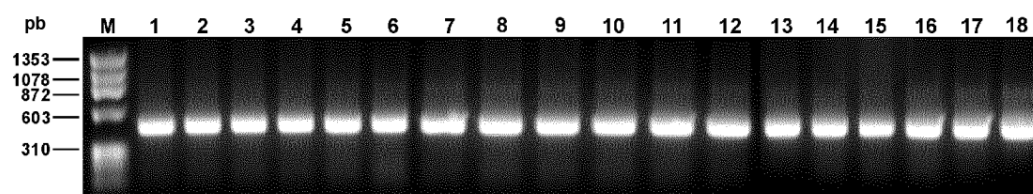


Figura 4

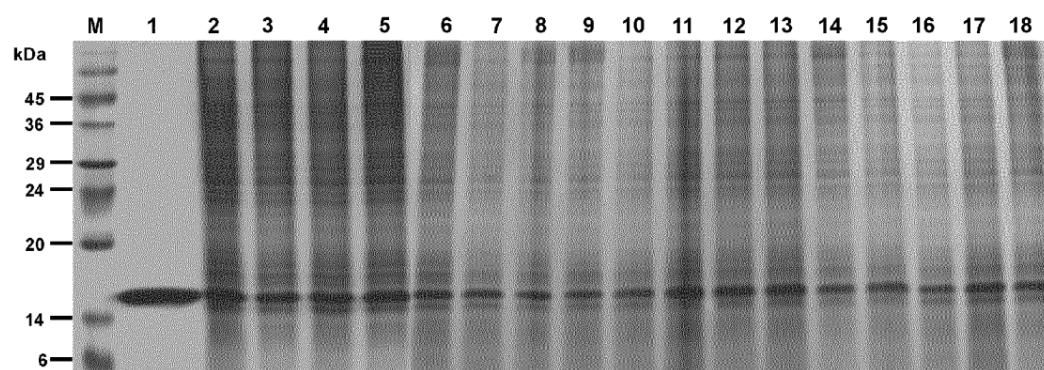


Figura 5

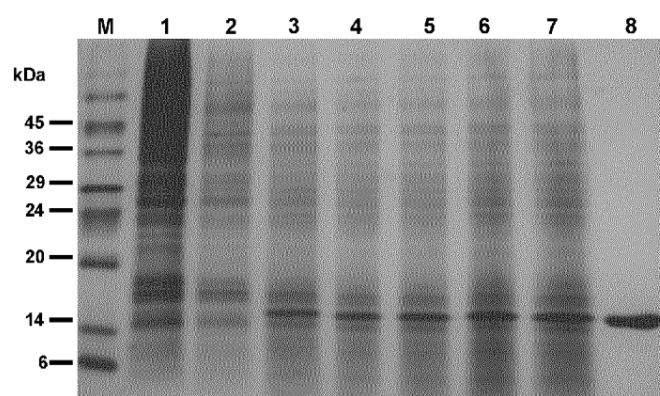


Figura 6

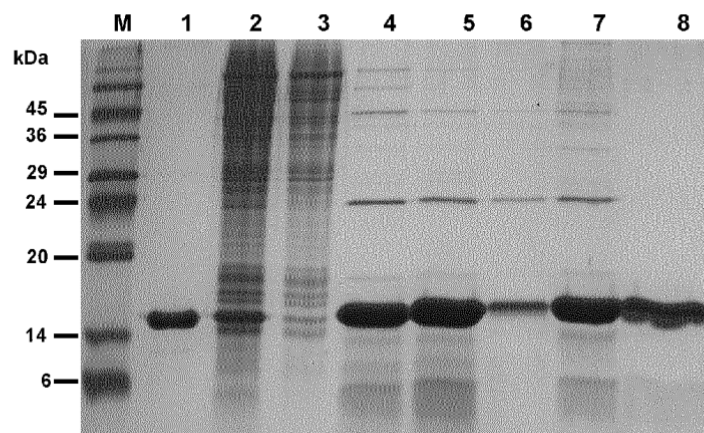


Figura 7

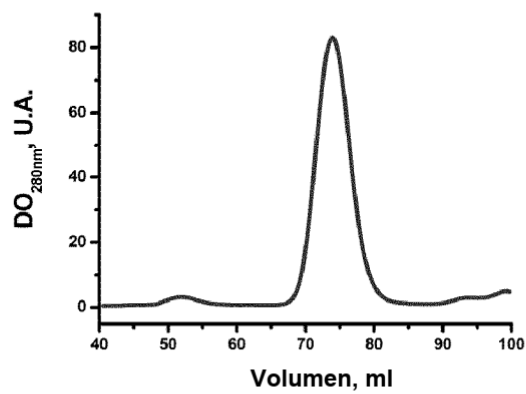


Figura 8

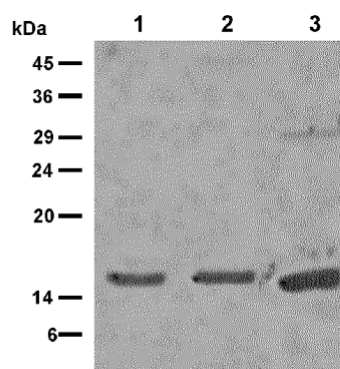


Figura 9

