

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 500**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/03** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/LT2013/000012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14065642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13760127 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2912173**

54 Título: **Proceso de preparación y purificación de la proteína oncostatina M humana recombinante**

30 Prioridad:

**23.10.2012 LT 2012099**

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

**26.06.2020**

73 Titular/es:

**UAB BIOTECHNOLOGINES FARMACIJOS  
CENTRAS "BIOTECHPHARMA" (100.0%)  
Mokslininku g. 4  
08412 Vilnius, LT**

72 Inventor/es:

**BUMELIS, VLADAS ALGIRDAS;  
SUDZIUVIENE, SAULE;  
MAKAUSKAS, NERIJUS y  
PUKAITE, LINA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 769 500 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso de preparación y purificación de la proteína oncostatina M humana recombinante

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína inmunomoduladora útil como agente antivírico y antitumoral. La presente invención también se refiere a la inserción de un gen, que codifica la proteína madura nativa, en un huésped adecuado; la producción del cultivo de cepa recombinante y la estimulación de la expresión del polipéptido heterólogo y su acumulación en cuerpos de inclusión insolubles. En particular, la presente invención divulga un proceso de preparación de la proteína oncostatina M madura humana utilizando un gen correspondiente que codifica la proteína OSM madura nativa, insertado en una cepa de *Escherichia coli* recombinante, proporcionando así una forma madura de proteína N-metionilada. La invención también se refiere a un proceso para el aislamiento y la purificación de dicha proteína a partir de la fracción insoluble de la cepa bacteriana durante la solubilización, el oxidamiento y el sometimiento del material a cromatografía. La preparación de la proteína recuperada se formula para lograr su estabilidad.

Antecedentes de la invención

20 La oncostatina M (OSM) se identificó inicialmente como una citoquina polipeptídica que inhibía el crecimiento *in vitro* de células de melanoma y otros tumores sólidos. La OSM muestra similitudes significativas en la secuencia de aminoácidos primaria y la estructura secundaria predicha con el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 11 (IL-11). El análisis de los genes que codifican estas proteínas revela una organización de exones compartida que sugiere una descendencia evolutiva a partir de un gen ancestral común. Los datos recientes indican que la OSM también comparte una serie de actividades *in vitro* con otros miembros de esta familia de citoquinas. Los efectos biológicos superpuestos parecen explicarse por el hecho de que comparten subunidades de receptores. [Bruce AG, Linsley PS, Rose TM. Oncostatin M. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4(2):157-70].

30 La forma humana de OSM se aisló originariamente en 1986 a partir del medio de crecimiento de células de linfoma histiocítico U-937 tratadas con PMA por su capacidad para inhibir el crecimiento de líneas celulares establecidas a partir de melanomas y otros tumores sólidos [Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ (diciembre de 1986). "Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (24): 9739-43]. Una proteína robusta, OSM, es estable entre pH 2 y 11 y resistente al calentamiento durante una hora a 56 °C. Una secuencia de aminoácidos parcial permitió el aislamiento de ADNc de OSM humana y subsiguientemente clones genómicos [Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, Marquardt H, Zarling JM, Shoyab M, Wei CM (julio de 1989). "Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M". *Mol. Cell. Biol.* 9 (7): 2847-53]. El clon completo de ADNc de hOSM codifica un precursor de 252 aminoácidos, cuyos primeros 25 aminoácidos actúan como un péptido señal secretor, que al eliminarlo proporciona la pro-OSM de 227 aminoácidos soluble. La escisión de la mayor parte de los 31 residuos C-terminales en un sitio de escisión de tipo tripsina proporciona la forma de 196 residuos completamente activa. En la hOSM están presentes dos sitios de N-glicosilación potenciales, conservándose ambos en la forma madura [Linsley PS, Kallestad J, Ochs V, Neubauer M (mayo de 1990). "Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M". *Mol. Cell. Biol.* 10 (5): 1882-90.; Malik N, Graves D, Shoyab M, Purchio AF (1992). "Amplification and expression of heterologous oncostatin M in Chinese hamster ovary cells". *DNA Cell Biol.* 11 (6): 453-9].

50 La OSM de 196 residuos es la forma aislada predominante de una diversidad de líneas celulares y corresponde a una glucoproteína de 28 KDa, aunque la pro-OSM de 227 residuos más grande puede aislarse a partir de células sobretransfectadas. La pro-OSM, aunque es un orden de magnitud menos eficaz en ensayos de inhibición del crecimiento, muestra una afinidad de unión similar hacia células en ensayos de unión de radioligandos [Malik N, Graves D, Shoyab M, Purchio AF (1992). "Amplification and expression of heterologous oncostatin M in Chinese hamster ovary cells". *DNA Cell Biol.* 11 (6): 453-9]. Por lo tanto, el procesamiento postraduccional puede desempeñar un papel significativo en la función *in vivo* de la OSM. Al igual que muchas citoquinas, la OSM se produce a partir de células mediante síntesis *de novo* seguida de liberación a través de la vía de secreción clásica. No obstante, la OSM se puede liberar a partir de depósitos preformados dentro de leucocitos polimorfonucleares en la desgranulación. [Grenier A, Dehoux M, Boutten A, Arce-Vicioso M, Durand G, Gougerot-Pocidaló MA, Chollet-Martin S (febrero de 1999). "Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils". *Blood* 93 (4): 1413-21]. Todavía sigue siendo incierto cómo se dirige la OSM a estos compartimentos intracelulares.

60 Entre las otras, las células huésped más disponibles para la producción de OSM humana recombinante es *Escherichia coli*, a partir de la cual se aisló, se purificó y se caracterizó la oncostatina recombinante (OSM) y se estableció el uso de rmetHuOSM en tumores malignos comúnmente asociados con infecciones neutropénicas durante el tratamiento, tales como cáncer de mama, linfoma y leucemia [Bruce AG, Linsley PS, Rose TM. Oncostatin M. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4(2):157-70].

Se han desarrollado una serie de procesos para la síntesis, el aislamiento y la purificación de OSM recombinante en *E. coli*.

Por ejemplo, Sporeno E. et al. ["Production and structural characterization of amino terminally histidine tagged human oncostatin M in *E. coli*", CYTOKINE, Academic Press Ltd, Filadelfia, PA, Estados Unidos, Vol. 6, N° 3, publ. 01/05/1994, páginas 255-264] divulga la producción y la purificación de una forma modificada de OSM, en la que para la expresión de la proteína diana recombinante se introdujo el plásmido pT7-7 en células *E. coli* BL21. El producto estaba marcado con proteína OSM, que portaba una secuencia no natural de seis histidinas N-terminales (6xHis-OSM).

Para la producción a gran escala y el uso clínico, existe la necesidad de procedimientos eficaces de purificación de proteínas para eliminar el ADN del huésped y las impurezas, de forma que una proteína para administración humana pueda cumplir con los requerimientos necesarios mientras conserva su actividad biológica. En consecuencia, se han desarrollado procesos cromatográficos y combinaciones de los mismos para la purificación de OSM.

Es muy necesaria una cepa productora bacteriana que sea versátil en diferentes medios y temperaturas de cultivo. Las mutaciones de la cepa que responden a la formación de puentes de disulfuro y al correcto plegamiento de proteínas se regulan añadiendo antibióticos secundarios y ajustando la temperatura de cultivo. Así, la cepa creada permite obtener tanto la proteína insoluble como la soluble. La etapa de purificación es rápida y comprende un proceso de cromatografía de una única etapa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "rmetHuOSM" se refiere a una proteína producida por un microorganismo que se ha transformado con un gen hOSM o una modificación del mismo que codifica una proteína que tiene a) una secuencia de aminoácidos que es al menos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la rmetHuOSM humana nativa y b) propiedades fisicoquímicas que son idénticas a la OSM humana nativa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "microorganismo productor de rmetHuOSM" se refiere a un microorganismo que ha sido manipulado genéticamente para producir una proteína que posee actividad biológica asociada con la OSM humana.

Se puede generar un microorganismo productor de rmetHuOSM mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica OSM. De forma adecuada, la secuencia que codifica OSM puede ser parte de un vector de expresión. Preferentemente, la secuencia de OSM es la secuencia de OSM modificada por codón descrita en el presente documento.

La elección del vector, por ejemplo un vector de plásmido, de cósmido o de fago a menudo dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Los vectores adecuados incluyen pET21a+, pUC57/T y pT7a tal como se describen en el presente documento.

Los vectores para su uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina.

El vector puede comprender también una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUBHO, pE194, pAMBI, pIJ702 y pETII.

En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención está operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como mediante la célula huésped elegida.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos según la presente invención está operativamente unida a al menos un promotor.

Preferentemente, las células huésped son células procariontas. Ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados son las especies bacterianas gram positivas o gram negativas.

El genotipo de la célula huésped puede modificarse para mejorar la expresión.

Por ejemplo, la célula huésped *E. coli* puede sobreexpresar ARNt raros para mejorar la expresión de proteínas heterólogas tal como se ejemplifica/se describe por Kane [Curr Opin Biotechnol (1995), 6, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*"]. La célula huésped puede ser deficiente en una serie de enzimas reductoras, favoreciendo así la formación de enlaces de disulfuro estables tal como se ejemplifica/se describe por Bessette [Proc Natl Acad Sci USA (1999), 96, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm"].

Las células huésped bacterianas adecuadas incluyen E. coli. De forma adecuada, las cepas de E. coli incluyen Rosetta gami-2, JMI09 y K802, tal como se describen en el presente documento.

5 Por "aislado" y/o "purificado" se entiende que la proteína OSM se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo con una pureza de al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98%.

Para su uso en el proceso de la presente invención, se pueden utilizar diversos medios de separación.

10 Se pueden utilizar varios soportes de filtración en gel y se seleccionan del grupo que comprende: Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-75, Sephacryl S-200HR, Sephacryl S-100HR, Superose 12, Superose 6, Superdex 75, TSKgel G-2500PW, TSK gel G-3000 PW, Bio-Gel P-60, Bio-Gel P-100, etc. Preferentemente, se utiliza Sephadex G-25.

15 Pueden utilizarse diversos soportes de cromatografía de intercambio catiónico y pueden seleccionarse del grupo que comprende: SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, CM Sepharose FF, TSKgel SP-5PW, TSK gel SP-5PW-HR, Toyopearl SP-650M, Toyopearl SP-650S, Toyopearl SP-650C, Toyopearl CM-650M, Toyopearl CM-650S, soporte Macro-Prep High S, soporte Macro-Prep S, soporte Macro-Prep CM, etc.

### 20 Divulgación de la invención

#### Sumario de la invención

25 El objetivo principal de la presente invención es un proceso de preparación y purificación de la proteína oncostatina M humana recombinante (OSMnat), que comprende las etapas siguientes:

- 30 i) cultivar Escherichia coli recombinante que contiene un gen OSMnat,
- ii) cultivar dicha Escherichia coli recombinante en medio de cultivo complejo para producir proteína OSMnat, y
- iii) aislar y purificar proteína OSMnat recombinante a partir de cuerpos de inclusión o fracción de proteínas soluble.

Dicho gen OSM comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

35 Según el proceso de la presente invención, se cultiva Escherichia coli recombinante que contiene un gen OSMnat amplificando dicho gen y clonando dicho gen OSMnat modificado amplificado en un vector intermedio o de expresión, amplificando y aislando dicho gen OSMnat a partir de dicho vector clonado y transformando dicho vector de expresión en dicha Escherichia coli. La Escherichia coli se selecciona del grupo que consiste en Escherichia coli JM109, Escherichia coli BL21 (DE3), Escherichia coli K802 y Escherichia coli Rosetta gami-2. Dicha Escherichia coli tiene resistencia a antibióticos en correspondencia, de forma respetable, con la cepa huésped, tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina.

45 El vector adecuado se selecciona del grupo que consiste en pET21a+, pT7a, pJET1.2blunt, pQE-T7.

Según la presente invención, dicho gen OSMnat se clona en el vector pET21a+ aguas abajo del promotor temprano del bacteriófago T7. Se dice que el gen se encuentra en un marco de lectura del promotor, el operón lac deberá encontrarse aguas arriba del promotor T7, y la expresión del constructo deseado, que contiene un gen OSMnat (casete de expresión), se controla estrictamente y se termina con un terminador T7.

50 El medio de cultivo se selecciona de entre medios complejos tales como LB, YPD, TB, M9 o M9m, comprendiendo dicho medio de cultivo una o más fuentes de nitrógeno, seleccionadas del grupo que consiste en sales de amonio, nitratos, triptona, extracto de levadura e hidróxido de amonio, y una fuente de carbono, seleccionada del grupo que consiste en glicerol, glucosa, fructosa y similares, preferentemente glucosa.

55 La acumulación de biomasa se encuentra en un intervalo de 2 a 15 g/l, preferentemente de 5-7 g/l para medios complejos con respecto al peso celular en húmedo, teniendo dicho medio de cultivo los parámetros siguientes: (a) pH en el intervalo de 3,0 a 8,0, preferentemente de 6,0 a 6,8 para medio complejo, (b) temperatura en el intervalo de 25 a 45 grados C, preferentemente de 37 a 42 grados C, y (c) oxígeno disuelto: 20-80% de saturación, preferentemente 20-40% de saturación; y dicho cultivo se lleva a cabo durante un periodo de 4 a 10 horas de duración, preferentemente de 6 horas de duración.

60 La expresión de la proteína OSMnat recombinante se induce después de alcanzar la acumulación de biomasa apropiada utilizando un inductor del operón lac adecuado, tal como lactosa y similares, preferentemente IPTG a una concentración de 0,1 mM a 1 mM, preferentemente 0,25 mM.

65

Las formas de realización de la presente invención comprenden un proceso para aislar y purificar OSM a partir de un microorganismo productor de OSM, que comprende las etapas siguientes: a) lisar el microorganismo y separar el material insoluble que comprende OSM del material celular proteínico soluble; b) solubilizar la OSM presente en el material insoluble; c) oxidar la OSM en presencia de un par de agente oxidante/reductor; d) someter la solución a cromatografía y e) recuperar la OSM purificada.

Preferentemente, la OSM es oncostatina M metionilada recombinante humana (rmetHuOSM).

En una de las formas de realización preferidas de la presente invención, el par de agente oxidante/reductor es un par de glutatión oxidado/reducido, siendo la relación molar de glutatión oxidado con respecto al reducido de 1:5 a 1:20, preferentemente de 1:20.

En una forma de realización preferida de la presente invención en la etapa c) la OSM presente en el material insoluble se solubiliza utilizando un agente caotrópico, preferentemente a una concentración intermedia de un agente caotrópico, a un pH en el intervalo de 8,00 a 9,00.

La realización de la presente invención comprende además la separación de la OSM replegada del caótropro, en la que la OSM replegada se separa del caótropro mediante filtración en gel, siendo preferentemente la columna de filtración en gel Sephadex G-25.

La cromatografía de la etapa d) es una purificación por cromatografía de una etapa, preferentemente una cromatografía de intercambio iónico de una etapa.

La solubilización de la etapa b) de la presente invención podría realizarse utilizando clorhidrato de guanidinio, siendo la concentración de clorhidrato de guanidinio de 3,0 a 7,0, preferentemente de 6,0-6,2 M.

La etapa d) del proceso de la presente invención se realiza en una columna CM-Sepharose o SP-Sepharose, preferentemente a un pH de 5,2 a 5,6.

En una de las formas de realización de la presente invención, un proceso para aislar y purificar rmetHuOSM a partir de un microorganismo productor de OSM comprende: a) lisar el microorganismo y separar el material insoluble que contiene rmetHuOSM del material proteínico soluble; b) solubilizar la rmetHuOSM presente en el material insoluble; c) oxidar la rmetHuOSM utilizando glutatión oxidado en presencia de glutatión reducido; d) separar la rmetHuOSM replegada del agente caotrópico y e) purificar rmetHuOSM por cromatografía de una sola etapa.

Uno de los objetos importantes es una preparación de proteína OSM purificada, obtenida mediante el proceso de la presente invención.

La invención se describe a continuación con más detalles y con referencia a los dibujos y los ejemplos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos:

La preparación de la proteína oncostatina M madura humana según la presente invención se ilustra en las figuras 1-9.

La figura 1 es el mapa de un vector de expresión. El vector de expresión es el plásmido pET21a+/OSM, que porta el gen de oncostatina M, insertado a través de los sitios diana de las endonucleasas de restricción NdeI y HindIII.

La figura 2 muestra la secuencia y la traducción del gen rmetHuOSM en la cadena polipeptídica. La figura 2 también muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína.

La figura 3 representa la comparación de tres cepas de E. coli, tal como se muestra en SDS-PAGE en inmunotransferencia Western. Las cepas de E. coli BL21 (DE3), K802 y Rosetta gami-2 se presentan, en consecuencia, en los carriles 1-2, 3-4 y 5-6. La primera muestra es la fracción soluble de proteína celular, la segunda es la fracción insoluble.

La figura 4 representa el crecimiento de E. coli Rosetta gami-2/pET21a+/OSM en un fermentador de 3 l en medio M9 modificado. Se presentan parámetros operativos en línea y fuera de línea, tales como saturación de oxígeno, pH, temperatura, velocidad del agitador, velocidad del flujo de aire y densidad óptica.

La figura 5 representa una imagen de SDS-PAGE después del proceso de biosíntesis, presentándose en el primer carril un marcador de peso molecular (correspondiente a los valores de la figura 3), se cargaron 10 microgramos de fracción soluble en el segundo carril y se cargaron 10 microgramos de fracción celular insoluble en el tercer carril.

La figura 6 representa la pureza de rmetHuOSM procesada según la presente invención y formulada según se evalúa por SDS-PAGE, ambas en condiciones reductoras. Primer carril: un marcador de proteína preteñido de Thermo Fisher Scientific (Fermentas), con patrones moleculares de 10, 25, 35, 40, 55, 70, 100 y 130 kDa; segundo a cuatro carriles: OSM purificada en condiciones reductoras, 1,25, 0,5 y 0,25 microgramos de muestra cargada en carriles, en consecuencia.

La figura 7 representa la pureza de rmetHuOSM procesada según la presente invención y formulada según se evalúa por HPLC de fase inversa.

La figura 8 presenta dos espectros de masas del espectrómetro de masas ESI-TOF, tal como se describe en el ejemplo 7.

Figura 9. Comparación de la secuencia teórica con los datos adquiridos. Como puede observarse, la metionina N-terminal se elimina después del proceso de purificación y solo la secuencia completamente nativa de OSM se retiene en la solución de la preparación final.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un procedimiento para producir ADN recombinante que codifique un polipéptido que muestre propiedades fisicoquímicas de oncostatina (196) M humana madura. Otro objetivo de la presente invención es producir OSM196 mediante fermentación controlada. Otro objetivo más de la presente invención es obtener proteína OSM en forma pura. Un objeto adicional de la presente invención es preparar una composición en solución que comprenda dicha proteína OSM humana recombinante.

Se usó una lanzadera pCMV que portaba una secuencia de marco de lectura abierta completa con prepéptidos y propéptidos como matriz para la amplificación de genes. La secuencia es de origen de ADNc. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la figura 2. En otro aspecto, se proporciona un plásmido de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la figura 2 (SEQ ID NO: 1):

1 ATGGGGGTAC TGCTCACACA GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGCACT  
 51 CCTGTTTCCA AGCATGGCGA GCATGGCGGC TATAGGCAGC TGCTCGAAAG  
 101 AGTACCGCGT GCTCCTTGGC CAGCTCCAGA AGCAGACAGA TCTCATGCAG  
 151 GACACCAGCA GACTCCTGGA CCCCTATATA CGTATCCAAG GCCTGGATGT  
 201 TCCTAAACTG AGAGAGCACT GCAGGGAGCG CCCCAGGGCC TTCCCCAGTG  
 251 AGGAGACCCT GAGGGGGCTG GGCAGGCGGG GCTTCCTGCA GACCCTCAAT  
 301 GCCCACTGG GCTGCGTCTT GCACAGACTG GCCGACTTAG AGCAGCGCCT  
 351 CCCCAAGGCC CAGGATTTGG AGAGGTCTGG GCTGAACATC GAGGACTTGG  
 401 AGAAGCTGCA GATGGCGAGG CCGAACATCC TCGGGCTCAG GAACAACATC  
 451 TACTGCATGG CCCAGCTGCT GGACAACCTCA GACACGGCTG AGCCACGAA  
 501 GGCTGGCCGG GGGGCCTCTC AGCCGCCAC CCCCACCCT GCCTCGGATG  
 551 CTTTTCAGCG CAAGCTGGAG GGCTGCAGGT TCCTGCATGG CTACCATCGC  
 601 TTCATGCACT CAGTGGGGCG GGTCTTCAGC AAGTGGGGGG AGAGCCCGAA  
 651 CCGGAGCCGG AGACACAGCC CCCACCAGGC CCTGAGGAAG GGGGTGCGCA  
 701 GGACCAGACC CTCCAGGAAA GGCAAGAGAC TCATGACCAG GGGACAGCTG  
 751 CCCCGGACGC GTGTTTAA

La secuencia del gen OSM se obtuvo de OriGene Technologies, Inc. en la lanzadera de ADN pCMV6. La secuencia de ADN codificante obtenida en este vector es tal como se presenta en la figura 2, que refleja el marco de lectura abierto completo del gen OSM, con su secuencia señal en el extremo N-terminal de la proteína (presentada en el presente documento como texto subrayado) y la secuencia pro en el extremo C-terminal de proteína (presentada como texto en cursiva).

La secuencia génica sin sus secuencias pre y pro se designó como OSM(196) para hacer referencia a su longitud de secuencia de aminoácidos. El gen codifica la secuencia de proteínas presentada en el presente documento. La metionina N-terminal es un artefacto de sistema de expresión bacteriano.

De forma adecuada, la expresión tiene un promotor T7 potente. Preferentemente, el plásmido de expresión es pET21a+/OSM

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el plásmido de expresión según la invención. De forma adecuada, la célula huésped es *E. coli*. En una forma de realización, la *E. coli* es la cepa Rosetta gami-2 de *E. coli*, que porta un plásmido pRARE adicional que codifica ARNt de codones raros. La cepa Rosetta gami-2 también tiene dos mutaciones: *trx* y *gor*, lo que permite plegar la proteína recombinante de una forma correcta. Estas mutaciones se ajustan adicionalmente en temperaturas de cultivo inferiores a las óptimas.

En otro aspecto, se proporcionan unas secuencias de cebadores para la amplificación de una secuencia de hOSM modificada. En consecuencia, las secuencias de cebadores son las siguientes:

cebador directo: 5'-AAACATATGGCGGCTATAGGCAGCT-3' y

cebador inverso 5'-TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT-3'.

De forma adecuada, el ADN recombinante de la lanzadera pCMV se amplifica utilizando ADN polimerasa recombinante, tal como Pfu o Taq. Después de la amplificación, el producto de PCR se clona directamente en el plásmido intermedio, o se digiere con las endonucleasas de restricción NdeI y HindIII y se clona en el plásmido pET21a+ digerido en consecuencia. Después de la transformación en una cepa intermedia de *E. coli*, tal como JM109 o RRI, los clones se seleccionan, se verifican y se vuelven a transformar en una cepa de expresión.

En consecuencia, la biosíntesis del clon de expresión verificado se realiza utilizando medio M9 modificado u otro medio complejo. El proceso de fermentación se realiza en un biorreactor, utilizando controladores de salida tales como pO<sub>2</sub> y electrodos de pH, Thermopore o agitador. Antes de la inducción, la temperatura de cultivo se eleva de +37 °C a +42 °C, si se desea una forma de proteína insoluble.

La presente invención también proporciona un proceso novedoso para aislar y purificar rmetHuOSM a partir de un microorganismo productor de OSM.

En consecuencia, en este aspecto de la invención, se proporciona un proceso para aislar y purificar OSM a partir de un microorganismo productor de OSM que comprende las etapas siguientes: a) lisar el microorganismo y separar el material insoluble que comprende OSM del material proteínico soluble; b) solubilizar la OSM presente en el material insoluble; c) oxidar la OSM en presencia de un par de agente oxidante/reductor; d) someter la solución a cromatografía y e) recuperar la OSM purificada.

Antes de la lisis, las células se recogen del cultivo y se pueden concentrar si es necesario, por filtración, centrifugación y otros procedimientos convencionales. En una forma de realización preferida de la presente invención, el microorganismo que produce OSM es *E. coli*. Las cepas adecuadas de *E. coli* para la producción son conocidas por el experto en la técnica.

Según los procedimientos de la presente invención, las membranas celulares de los microorganismos se lisan utilizando técnicas convencionales tales como homogeneización, sonicación o ciclos de presión. Los procedimientos preferidos incluyen sonicación u homogeneización con un homogeneizador Rannie.

Después de haber lisado las células, la materia particulada que contiene rmetHuOSM se separa de la fase líquida del lisado y se resuspende en una solución tampón apropiada. El material particulado se puede lavar opcionalmente para eliminar las proteínas de *E. coli* hidrosolubles presentes en el mismo.

De forma adecuada, la rmetHuOSM presente en la materia particulada se solubiliza en presencia de un agente solubilizante preferentemente por encima de condiciones de pH neutro. El agente solubilizante es un agente caotrópico (es decir, un desnaturante de proteínas que disocia enlaces de hidrógeno y afecta a la estructura terciaria de las proteínas causando su despliegue) generalmente en una solución tampón acuosa.

En consecuencia, en una forma de realización, la OSM presente en el material insoluble se solubiliza utilizando un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos representativos incluyen urea y clorhidrato de guanidinio. El clorhidrato de guanidinio es un agente caotrópico más fuerte y se prefiere evitar la carbamoylación de la cadena de polipéptidos que puede tener lugar si se utiliza una solución concentrada de urea. En consecuencia, en una forma de realización, la etapa b) incluye la incubación con clorhidrato de guanidinio. La concentración del agente caotrópico dependerá del agente particular que se utilice y de la cantidad de material celular presente. En una forma de realización, en la etapa b), la concentración de clorhidrato de guanidinio es de 3,0 a 7 M y de la forma más preferida se emplea una solución de clorhidrato de guanidinio 6 M.

El pH puede ajustarse añadiendo tampones adecuados, y preferentemente el pH variará de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0 y de la forma más preferida dentro de un intervalo de pH 8,4 - 8,8.

Después de la solubilización de la rmetHuOSM, las partículas insolubles se separan y se descartan.

De forma adecuada, la rmetHuOSM soluble se oxida en presencia de un par de agente reductor/oxidante. Los pares de agente reductor/oxidante adecuados incluyen, por ejemplo, cisteína y cistina, ditiotreitól y su forma oxidada, glutatión y glutatión oxidado [B. Fischer, I. Summer y P. Goodenough. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechn. Bioengn.*, 41, 3-13 (1993); V. Lozanov, C. Guarnaccia, A. Patthy, S. Foot y S. Pongor. Synthesis and cystine/cysteine-catalyzed oxidative folding of the Amaranth  $\alpha$ -amylase inhibitor. *J. Peptide Res.*, 50, 65-72 (1997); Y-J. Li, D. M. Rothwarf y H. A. Scheraga. An unusual adduct of dithiothreitol with a pair of cysteine residues of a protein as a stable folding intermediate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 120, 2668-2669 (1998)]. Ventajosamente, se ha descubierto que el rendimiento de rmetHuOSM plegada correctamente, es decir, rmetHuOSM oxidada que tiene la conformación nativa correcta de enlaces disulfuro, se aumenta facilitando la reorganización de enlaces disulfuro mediante el uso de un tampón rédox de glutatión (glutatión y glutatión oxidado). En consecuencia, en una forma de realización, el par de agente reductor/oxidante utilizado en la etapa c) es un tampón rédox de glutatión (glutatión y glutatión oxidado).

La rmetHuOSM se oxida por medio del glutatión oxidado y la presencia del agente reductor, glutatión, en el tampón rédox reduce sustancialmente la formación de rmetHuOSM plegada incorrectamente, es decir, rmetHuOSM con enlaces disulfuro incorrectos. La relación de glutatión:glutatión oxidado en el tampón rédox se puede determinar fácilmente por parte de un experto en la técnica. Preferentemente, se emplea un exceso de glutatión, de forma más preferida una relación de 5:1 a 20:1 en peso molecular de glutatión:glutatión oxidado. De la forma más preferida, se emplea una relación molar 20:1 de glutatión:glutatión oxidado.

De forma adecuada, el replegamiento de rmetHuOSM en presencia de tampón rédox que contiene un par de glutatión reducido/oxidado se realiza a una concentración intermedia de un agente caotrópico. En una forma de realización, el replegamiento se produce a una concentración intermedia de clorhidrato de guanidinio. De forma adecuada, la concentración de clorhidrato de guanidinio es de 3 M a 7 M y de la forma más preferida en solución tampón que contiene de 6,0 a 6,2 M de clorhidrato de guanidinio.

El rendimiento del replegamiento de rmetHuOSM depende en gran medida del valor de pH del tampón de replegamiento que contiene la concentración intermedia de clorhidrato de guanidinio y el sistema rédox.

Preferentemente, la reacción de replegamiento se realiza manteniendo el pH de la solución tampón a de pH 7,0 a pH 9,8 y de la forma más preferida de pH 8,4 a pH 8,8. La solución resultante que contiene rmetHuOSM correctamente plegada se centrifuga o se filtra preferentemente para eliminar cualquier material particulado remanente y en la solución desechada resultante se realiza un intercambio de tampón para eliminar el agente caotrópico residual tal como el clorhidrato de guanidinio y los componentes del sistema rédox tales como el glutatión y el glutatión oxidado.

En consecuencia, en una forma de realización adicional, el proceso de la invención comprende adicionalmente separar la OSM replegada del caotrópico. De forma adecuada, cuando el agente caotrópico es el clorhidrato de guanidinio, se puede eliminar de una solución que contiene rmetHuOSM replegada por filtración en gel. Los medios de filtración en gel adecuados serán familiares para los expertos en la técnica. En una forma de realización, los medios de filtración en gel son medios de cromatografía Sephadex G-25.

De forma adecuada, el pH de la solución tampón se ajusta a un intervalo de pH adecuado para la filtración en gel.

Cuando el medio de filtración en gel es Sephadex G-25, el pH se ajusta de forma adecuada para que se encuentre entre aproximadamente 5,2 y 5,6 y sea preferentemente de 5,4. La mezcla resultante se filtra y el filtrado recogido se expone para la maduración. De forma adecuada, el filtrado recogido se expone durante aproximadamente 20 a 90 horas para una maduración de rmetHuOSM plegada correctamente. La rmetHuOSM plegada correctamente se separa de cualquier contaminante remanente empleando procedimientos cromatográficos.

Se prefiere emplear cromatografía líquida de intercambio iónico para recuperar la rmetHuOSM purificada. Los procedimientos adecuados para la cromatografía líquida de intercambio iónico serán familiares para los expertos en la técnica. En una forma de realización del proceso de la invención, la cromatografía en la etapa d) es una purificación por cromatografía en una etapa. De forma adecuada, la cromatografía es una cromatografía de intercambio iónico de una etapa.

En un modo de puesta en práctica preferido de este aspecto de la invención, se recuperan altos rendimientos de rmetHuOSM purificada mediante el uso de una columna de intercambio iónico CM-Sepharose o SP Sepharose que opera preferentemente a un pH de un tampón de cromatografía de 5,2 a 5,6, y de forma más preferida a un pH de aproximadamente 5,4.

En consecuencia, en una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un proceso para aislar y purificar rmetHuOSM de un microorganismo productor de OSM que comprende: 1) lisado del microorganismo y separación del material insoluble que contiene rmetHuOSM del material de proteínas soluble; 2) solubilización de la rmetHuOSM presente en el material insoluble; 3) oxidación de la rmetHuOSM utilizando glutatión oxidado en presencia de glutatión reducido; 4) separación de rmetHuOSM replegada del caotrópico y 5) purificación por cromatografía de una única etapa de rmetHuOSM.



En otra forma de realización, la invención proporciona un proceso que comprende las etapas siguientes: 1) lisado del microorganismo y separación del material insoluble que contiene rmetHuOSM del material de proteínas soluble; 2) solubilización de la rmetHuOSM presente en el material insoluble; 3) oxidación de la rmetHuOSM en presencia de un par de agente reductor y oxidante; 4) separación de la rmetHuOSM del agente solubilizante; 5) maduración dependiente del tiempo de rmetHuOSM; 6) separación selectiva de rmetHuOSM plegada correctamente de rmetHuOSM plegada, agregada y alterada incorrectamente por cromatografía de intercambio catiónico; 7) transición de rmetHuOSM altamente purificada y plegada correctamente a su formulación líquida estable por cromatografía sobre columna de filtración en gel.

Modos de llevar a cabo la invención

**Ejemplos de formas de realización de la invención**

En los ejemplos siguientes, se utilizó como cepa huésped transitoria la cepa JM109 de Escherichia coli, para la transformación con el vector, se utilizó la cepa E. coli Rosetta gami-2 como cepa de expresión. El huésped E. coli transformado de la presente invención contenía un vector de expresión preparado a partir de pET21a+ (Novagen). Este vector se ligó con la secuencia de ADN truncada amplificada de OSM nativa después de una digestión de doble restricción con NdeI+HindIII. El proceso de fermentación implicó la aplicación de enfoques para obtener cultivos celulares de alta expresión descritos en el presente documento. La proteína OSM se acumula en cuerpos de inclusión y se purifica utilizando técnicas simples tal como se describe en otra parte del documento.

Serán evidentes varias modificaciones y variaciones de los procedimientos y sistemas descritos de la presente invención para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a formas de realización preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas formas de realización específicas. De hecho, se pretende que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología molecular o sectores relacionados.

**Ejemplo 1. Amplificación del gen OSM maduro**

La preparación del gen OSM por fusión consistió en un proceso de dos etapas: optimización por PCR y amplificación de genes con PCR, añadiendo el sitio NdeI en su extremo 5' y HindIII en su extremo 3'. Los cebadores fueron: CEBADOR DIRECTO: 5'-AAACATATGGCGGCTATAGGCAGCT-3' y CEBADOR INVERSO 5'-TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT-3'. La secuencia de cebadores directos e inversos se proporciona en una dirección de 5' a 3'. La optimización por PCR para el gen OSM se realizó para recibir un producto de PCR específicamente amplificado en un intervalo de concentración deseable. Los parámetros de optimización incluyeron concentración de MgSO<sub>4</sub> (1 - 4 mM), concentración de cebadores (0,1 - 1 μM) y temperatura de hibridación (58 - 72 °C), formando así un experimento neto de 48 condiciones de reacción diferentes. La ADN polimerasa utilizada para la amplificación fue Pfu (recombinante, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) debido a su característica de lectura de prueba, buena procesividad y baja tasa de error. Para el producto de PCR OSM (longitud de 609 pb), las mejores condiciones fueron las siguientes: 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1 μM de cada cebador, y programa con una etapa de hibridación de dos etapas:

Tabla 1

Ciclo Nº	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
20	Desnaturalización del ADN de la matriz	95 °C	30 s
	Hibridación de cebador	59,8 °C	45 s
	Síntesis de ADN	72 °C	80 s
25	Desnaturalización del ADN de la matriz	95 °C	30 s
	Hibridación de cebador	72 °C	80 s
	Síntesis de ADN	72 °C	10 min

El producto de PCR pudo obtenerse en un intervalo de concentración de 100-120 ng/μl.

**Ejemplo 2. Clonación del gen OSM en plásmido pET21a+**

El producto de PCR obtenido se purifica utilizando el kit de purificación por PCR GeneJet de Fermentas y se digiere utilizando dos endonucleasas de restricción: NdeI y HindIII. La digestión se realiza durante toda la noche a +37 °C de

temperatura. Después de la digestión, el fragmento de ADN se purifica repetidamente utilizando el kit, eliminando fragmentos pequeños de nucleótidos y restrictasas. El plásmido pET21a+ (Novagen) se digiere y se purifica de la misma forma, pero el kit de purificación utilizado para un fragmento de ADN largo es el kit de purificación de plásmido GenJet. Los extremos adhesivos del plásmido se desfosforilan utilizando la enzima CIAP, que se inactiva antes de la ligadura. El gen y el plásmido se ligan en una relación molecular de 10:1 durante 16 horas a una temperatura de +4 °C utilizando ADN ligasa de T4 (5 unidades por mezcla de reacción). La mezcla de ligadura se transforma en la cepa de E. coli JM109 químicamente competente. Después de la selección del clon del inserto de tamaño correcto, un clon positivo seleccionado se transforma en la cepa de expresión de E.coli Rosetta gami-2. El clon pET21a+/OSM se cultiva, la estructura del ADN plasmídico se confirma utilizando el patrón de análisis de restricción. El mapa del plásmido se presenta en la figura 1, junto con el patrón de electroforesis típico.

El plásmido pET21a +/OSM también se clonó para comparación en cepas de E. coli BL21 (DE3) y K802. Los clones positivos se verificaron mediante análisis de restricción y consumo de metabolitos.

La figura 3 representa la comparación de tres cepas de E. coli, tal como se muestra en SDS-PAGE e inmunotransferencia Western. Las cepas de E. coli BL21 (DE3), K802 y Rosetta gami-2 se presentan, en consecuencia, en los carriles 1-2, 3-4 y 5-6. La primera muestra es una fracción soluble de proteína celular, la segunda es fracción insoluble. Como se puede observar, solo la cepa de E. coli Rosetta gami-2 es un clon de alta producción.

### Ejemplo 3. Preparación del banco de células maestras de investigación

Después de la caracterización primaria, el clon Rosetta gami-2 pET21a+/OSM se sembró en medio LB en un matraz de 150 ml y se cultivó durante toda la noche a +37 °C. Después de 16 horas, el cultivo se volvió a sembrar en 150 ml de medio LB con una densidad óptica final de 0,1 U.A. y adicionalmente se cultivó en agitador microbiológico orbital durante cuatro horas a +37 °C. La densidad óptica final antes de la conservación fue de 3,4 U.A. Se añadió una concentración final del 10% de glicerol estéril al cultivo microbiano y este se dividió en partes alícuotas en viales en un volumen de 1 ml. El material se congeló y se almacenó a -75 °C de temperatura.

### Ejemplo 4. Descripción del proceso de biosíntesis

En un fermentador de 7 l se prepararon 4,7 l de medio complejo, se esterilizaron y se les inoculó el inóculo hasta una densidad óptica final de 0,2 U.A. La velocidad de agitación varió entre 200 y 900 rpm. Las velocidades de aireación variaron de aproximadamente 0,3 l/min de flujo de aire del aire suministrado. Composición del medio M9m (para fermentación) (g/l): extracto de levadura: 20,0, cloruro de amonio: 5,0, sulfato de magnesio heptahidratado: 0,5, hidrogenofosfato de disodio: 4,7, dihidrogenofosfato de potasio: 4,5, monohidrato de glucosa: 22; suplementado con 50 ng/l de ampicilina y 34 ng/l de cloranfenicol. El aire suministrado se mezcló con suficiente oxígeno cuando fue necesario, para mantener el oxígeno disuelto a una saturación de aproximadamente el 20 al 60%. La fermentación se realizó a 37 grados C durante 3 horas. Después de 3 horas, se inicia una inducción con una concentración final de solución de IPTG de 0,25 mM y la temperatura se eleva a 42 °C. Después de 2 horas de inducción, el material celular se recolecta por medio de centrifugación a 8000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El registro de lote de biosíntesis típico se presenta en la figura 4. En esta figura, se presentan parámetros del crecimiento de E. coli Rosetta gami-2/pET21a+/OSM en fermentadores de 3 l operativos en línea y fuera de línea, tal como la saturación de oxígeno, el pH, la temperatura, la velocidad del agitador, la velocidad del flujo de aire y la densidad óptica. La figura 5 representa una imagen de SDS-PAGE después del proceso de biosíntesis, presentando en el primer carril un marcador de peso molecular, se cargaron 10 microgramos de fracción soluble en el segundo carril y se cargaron 10 microgramos de fracción celular insoluble en el tercer carril.

### Ejemplo 5. Descripción del proceso aguas abajo

La pasta celular que contenía rmetHuOSM en células E. coli transformadas, tal como se obtuvo a partir del ejemplo 4, se dispersó en un tanque con agitador en 10 partes de tampón Tris 0,1 M (pH 7,50, que contenía EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, DTT 5 mM) a una temperatura de aproximadamente 5 °C. La suspensión se hizo pasar a través de un homogeneizador de alta presión Rannie dos veces o se sonicó durante 3 minutos para 1 g de biomasa. El homogeneizado se centrifugó a una temperatura de aproximadamente 5 °C. Los sedimentos se diluyeron con 10 partes de tampón Tris 0,025 M, pH 8,0, que contiene NaCl 0,5 M, polisorbato-80 al 0,1%, se mezclaron con un mezclador IKA y la mezcla resultante se centrifugó a una temperatura de 5 °C. El sobrenadante se decantó y el residuo remanente se resuspendió con un mezclador IKA en tampón Tris 0,025 M (pH 7,00, que contenía urea 1,3 M) para proporcionar una mezcla que tenía un volumen final de 10 partes de agua. El sobrenadante se decantó y el residuo remanente se resuspendió con un mezclador IKA en tampón Tris 0,025 M (pH 8,00, que contenía urea 0,6 M) para producir una mezcla que tenía un volumen final de 10 partes. La mezcla resultante se centrifugó a una temperatura de 5 °C y el sobrenadante se decantó y el residuo remanente se suspendió con un mezclador IKA en tampón Tris 0,025 M (pH 8,50, que contiene NaCl 0,5 M) para producir una mezcla que tenía un volumen final de 10 partes de agua. La mezcla resultante se centrifugó a una temperatura de 5 °C y el sobrenadante se decantó. El residuo resultante se suspendió con homogeneizador IKA en 6 partes de tampón de glicina/NaOH 50 mM, pH 8,7, que contenía GdmHCl 6 M; NaCl 0,5 M y DTT 20 mM durante 2-18 horas a una temperatura de 5 °C.

La mezcla resultante se centrifugó a una temperatura de 5 °C y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se añadió gota a gota a una solución de plegamiento (tampón de glicina/NaOH 25 mM, pH 8,7, que contenía para la concentración final 4 mM de GSH, 0,2 mM de GSSG, 0,5 M de L-arginina) en una relación 1:3. La mezcla resultante se ajustó a pH 8,70 y se mantuvo a aproximadamente 5 °C durante 60 horas. La solución se cargó en una Sephadex G-25 a 5 °C y se eluyó con acetato de sodio 20 mM (pH 5,30, que contenía NaCl 50 mM). El eluato se cargó en una columna CM-Sepharose a 25 °C. La rmetHuOSM biológicamente activa se eluyó de la columna con un gradiente lineal de acetato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM (pH 5,3) a acetato de sodio 20 mM, NaCl 400 mM (pH 5,3). El eluato que contenía rmetHuOSM altamente purificada se diluyó con tampón hasta una concentración final de acetato de Na 20 mM, NaCl 250 mM, pH 5,3. La figura 6 representa la pureza de la proteína procesada según la presente invención según se evalúa por SDS-PAGE, ambas en condiciones reductoras. Primer carril: un marcador de proteína preteñido de Thermo Fisher Scientific (Fermentas), con patrones moleculares de 10, 25, 35, 40, 55, 70, 100 y 130 kDa; segundo a cuatro carriles: OSM purificada en condiciones reductoras, 1,25, 0,5 y 0,25 microgramos de muestra cargada en carriles, en consecuencia.

### Ejemplo 6. Análisis por RP-HPLC

Se utilizó el procedimiento de RP-HPLC para evaluar la pureza de la proteína OSM. Este procedimiento se utilizó para analizar la pureza de OSM durante las etapas de purificación y en la solución de producto final. Los detalles experimentales se describen a continuación.

#### Detalles experimentales:

Fase móvil: A: 70% de agua, 30% de acetonitrilo y 0,2% de TFA; B: 20% de agua, 80% de acetonitrilo y 0,2% de TFA

Columna: Symmetry 300 C18, 4,6  $\phi$  250 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m.

Sistema de cromatografía: Sistema HPLC Alliance, Waters

Longitud de onda de detección: 280 nm

Caudal: 1 ml/min

Procedimiento del instrumento RP-HPLC

Tabla 2

Nº	Flujo,	Tiempo,	Móvil	Notas	
			A, %	B, %	
1	1,0	0	80	20	Inicial
2	1,0	1	80	20	Isocrático
3	1,0	20	64	36	Gradiente
4	1,0	21	10	90	Gradiente
5	1,0	22	10	90	Isocrático
6	1,0	23	80	20	Gradiente
7	1,0	27	80	20	Isocrático

La figura 7 representa la pureza de la rmetHuOSM procesada según la presente invención y formulada tal como se evalúa por HPLC de fase inversa. Como puede observarse a partir de la integración del área del pico, la pureza de la proteína purificada es de hasta el 91,2% con el 0,5% de la forma reducida de la misma.

### Ejemplo 7. Determinación de masa molecular de oncostatina M mediante espectrómetro de masa

Para la identificación de proteínas purificadas, se realizó la medición del peso molecular y la secuenciación parcial de OSM mediante procedimientos de espectrometría de masas. El equipo utilizado fue MicrOTOF q2 con fuente de ESI, Bruker. Materiales: acetonitrilo, ácido fórmico, columnas PD MiniTrap G-25, tampón de bicarbonato de amonio 5 mM.

Preparación de la muestra. El tampón de muestra se intercambia por tampón de bicarbonato de amonio 5 mM. Esto se realiza utilizando PD MiniTrap G-25 según las instrucciones del fabricante. Si es necesario, la solución de

muestra se concentra a 1 mg/ml. Antes de someter la muestra al análisis de EM, se diluye 1:1 (v:v) con acetonitrilo, solución en ácido fórmico al 0,2% a una concentración final de 0,5 mg/ml. Configuración del espectrómetro de masas:

5

Tabla 3

Nombre del parámetro	Valor
Nebulizador	0,3 bares
Gas seco	4,0 l/min
Temperatura seca	180 °C
Intervalo de masa	50-3000 m/z

Los espectros de masas se adquieren durante 5 minutos, después se promedian y se desconvolucionan utilizando el algoritmo de máxima entropía (véase la figura 8). La figura 8 presenta dos espectros de masas del espectrómetro de masas ESI-TOF. La masa medida de oncostatina M es 22449Da (tal como se observa en la figura 7, parte A). La masa medida difiere de la teórica en ~300 Da. Esto se debe a una molécula de glutatión que está unida al residuo Cys80. Después de la reducción de la proteína, se elimina la molécula de glutatión, tal como se observa en la figura 8, parte B (la masa detectada es igual a 22149 Da, que es el peso molecular de la proteína nativa).

El análisis de la secuencia de oncostatina M utilizando el espectrómetro de masas Maldi-Tof se realizó utilizando la velocidad Autoflex, Bruker. Los materiales fueron los siguientes: acetonitrilo, ácido trifluoroacético, columnas PD MiniTrap G-25, tampón de bicarbonato de amonio 25 mM y ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico.

Preparación de la muestra. El tampón de muestra se intercambia por tampón de bicarbonato de amonio 25 mM. Esto se realiza utilizando PD MiniTrap G-25 según las instrucciones del fabricante. Se añade tripsina con una relación 1:50 (Proteasa:Proteína) y esta solución se incubó a 37 °C durante 12 horas. La muestra se limpia con ZipTip (según las instrucciones del fabricante), se mezcla en volúmenes iguales con ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico solubilizado en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 0,1%. La muestra preparada (0,5-1  $\mu$ l) se lleva a una placa Maldi de acero inoxidable, las gotas se dejan secar completamente. Configuración del espectrómetro de masas:

25

Tabla 4

Nombre del parámetro	Valor
Fuente de iones 1	19,6 kV
Fuente de iones 2	16,7 kV
Lente	7,8 kV
Reflector	21,1 kV
Supresión de la matriz	hasta 430 Da

Se aplican 500-1500 disparos de láser a cada punto de muestra. Los péptidos resultantes de la digestión con oncostatina M se analizan y se comparan con masas teóricas de péptidos. La comparación de la secuencia teórica con los datos adquiridos se presenta en la figura 9. Tal como puede observarse, la metionina N-terminal se elimina después del proceso de purificación y solo se conserva la secuencia completamente nativa de OSM. Los resultados de secuenciación parcial confirman que la proteína purificada es de 196 aa de oncostatina M y que no tiene residuos de metionina en el extremo N-terminal. El 89% de la secuencia está cubierta.

35

#### Aplicabilidad industrial

La proteína oncostatina M y las preparaciones estables de la misma que pueden obtenerse según la presente invención son útiles como agente antivirico y antitumoral. La oncostatina M (OSM) se identificó inicialmente como una citoquina polipeptídica que inhibía el crecimiento *in vitro* de las células del melanoma y otros tumores sólidos. La OSM muestra similitudes significativas en la secuencia de aminoácidos primaria y la estructura secundaria predicha con el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 11 (IL-11). Los datos recientes indican que la OSM también comparte una serie de actividades *in vitro* con otros miembros de esta familia de citoquinas. La OSM de 196 residuos es la forma aislada predominante de una diversidad de líneas celulares y corresponde a una glucoproteína de 28 KDa, aunque la pro-OSM de 227 residuos más grande puede aislarse a partir de células sobretransfectadas.

45

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso de preparación y purificación de la proteína oncostatina M (OSMnat) humana recombinante, que comprende:

- i) cultivar *Escherichia coli* recombinante que contiene un gen OSMnat,
- ii) cultivar dicha *Escherichia coli* recombinante en un medio de cultivo complejo para producir proteína OSMnat, y
- iii) aislar y purificar proteína OSMnat recombinante a partir de cuerpos de inclusión o de fracción de proteínas soluble,

en el que dicha *Escherichia coli* recombinante que contiene un gen OSMnat se cultiva amplificando dicho gen y clonando dicho gen OSMnat modificado amplificado en un vector intermedio o de expresión, amplificando y aislando dicho gen OSMnat a partir de dicho vector clonado y transformando dicho vector de expresión en dicha *Escherichia coli*,

en el que dicho gen OSMnat comprende la SEQ ID NO: 1, dicha *Escherichia coli* es *Escherichia coli* Rosetta gami-2, y dicho vector es pET21a+, y

en el que el aislamiento y la purificación de la proteína OSMnat recombinante obtenida comprende las etapas siguientes:

- a) lisar el microorganismo y separar el material insoluble que comprende OSM del material celular proteínico soluble;
- b) solubilizar la OSM presente en el material insoluble;
- c) oxidar la OSM en presencia de un par de agente oxidante/reductor, en el que el par de agente oxidante/reductor es un par de glutatión oxidado/reducido, en el que la relación molar de glutatión oxidado y reducido es 1:20;
- d) someter la solución a cromatografía y
- e) recuperar OSM purificada.

2. El proceso según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo es un medio complejo, seleccionado de entre LB, YPD, TB, M9 o M9m, preferentemente M9m, en el que dicho medio de cultivo comprende una o más fuentes de nitrógeno, seleccionadas del grupo que consiste en sales de amonio, nitratos, triptona, extracto de levadura e hidróxido de amonio, y una fuente de carbono, seleccionada del grupo que consiste en glicerol, glucosa, fructosa, preferentemente glucosa.

3. El proceso según la reivindicación 1, en el que dicha *Escherichia coli* Rosetta gami-2 contiene un plásmido pRARE adicional.

4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho gen OSMnat se clona en el vector pET21a+ aguas abajo del promotor temprano del bacteriófago T7, encontrándose dicho gen en un marco de lectura del promotor, encontrándose el operón lac aguas arriba del promotor T7, y la expresión del constructo deseado, que contiene un gen OSMnat, está estrictamente controlada y terminada por el terminador T7.

5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha *Escherichia coli* tiene resistencia a antibióticos en correspondencia, de forma respetable, con la cepa huésped, tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina.

6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la acumulación de biomasa se encuentra en un intervalo de 2 a 15 g/l, preferentemente de 5-7 g/l para medios complejos con respecto al peso celular en húmedo, en el que dicho medio de cultivo tiene los parámetros siguientes: (a) pH en el intervalo de 3,0 a 8,0, preferentemente 6,0 a 6,8 para un medio complejo, (b) temperatura en el intervalo de 37 a 42 grados C, y (c) oxígeno disuelto: 20-80% de saturación, preferentemente 20-40% de saturación; y dicho cultivo se lleva a cabo durante un periodo de 4 a 10 horas de duración, preferentemente de 6 horas de duración.

7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de la proteína OSMnat recombinante se induce después de alcanzar la acumulación de biomasa apropiada utilizando un inductor del operón lac adecuado IPTG a una concentración de 0,1 mM a 1 mM, preferentemente de 0,25 mM.

8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la OSM en las etapas a) - c) es oncostatina M metionilada recombinante humana (rmetHuOSM).

- 5 9. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa b) la OSM presente en el material insoluble se solubiliza utilizando un agente caotrópico, preferentemente a una concentración intermedia de un agente caotrópico, a un pH en el intervalo de 8,00-9,00.
- 10 10. El proceso según la reivindicación 9, que además comprende separar la OSM replegada del caotropo, en el que la OSM replegada se separa del caotropo mediante filtración en gel, siendo la columna de filtración en gel preferentemente Sephadex G-25.
- 10 11. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solubilización de la etapa b) se realiza utilizando clorhidrato de guanidinio, siendo la concentración de clorhidrato de guanidinio de 3,0 a 7,0, preferentemente 6,0 M.
- 15 12. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de la etapa d) es una cromatografía de intercambio iónico de una etapa realizada en una columna CM-Sepharose o SP-Sepharose a un pH de 5,2 a 5,6.
- 20 13. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína OSM purificada obtenida es una OSM completamente nativa de 196 aminoácidos.

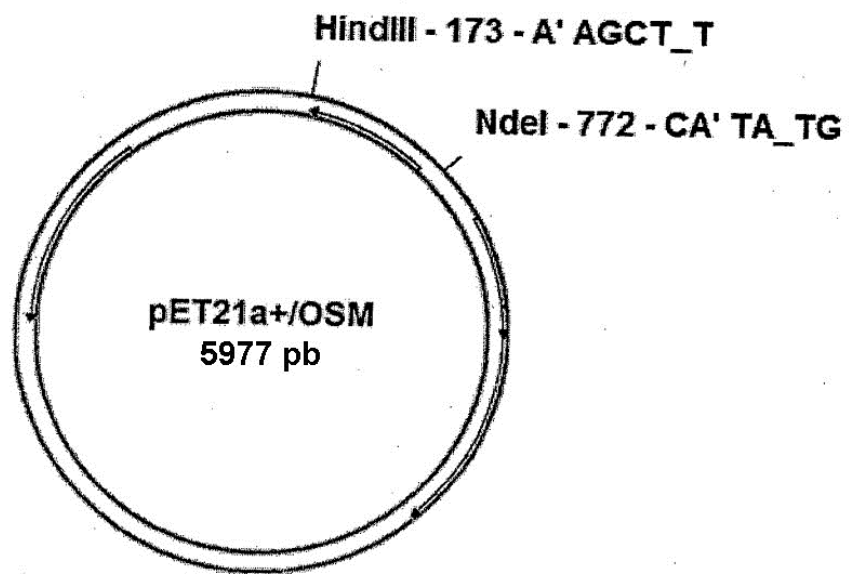


Fig. 1

**1 ATGGGGGTAC TGCTCACACA GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGCACT**  
**51 CCTGTTTCCA AGCATGGCGA GCATGGCGGC TATAGGCAGC TGCTCGAAAG**  
**101 AGTACCGCGT GTCCTTGGC CAGCTCCAGA AGCAGACAGA TCTCATGCAG**  
**151 GACACCAGCA GACTCCTGGA CCCCTATATA CGTATCCAAG GCCTGGATGT**  
**201 TCCTAAACTG AGAGAGCACT GCAGGGAGCG CCCCAGGGCC TTCCCAGTG**  
**251 AGGAGACCCT GAGGGGGCTG GGCAGGCGGG GCTTCCTGCA GACCCTCAAT**  
**301 GCCACACTGG GCTGCGTCCT GCACAGACTG GCCGACTTAG AGCAGCGCCT**  
**351 CCCAAGGCC CAGGATTTGG AGAGGTCTGG GCTGAACATC GAGGACTTGG**  
**401 AGAAGCTGCA GATGGCGAGG CCGAACATCC TCGGGCTCAG GAACAACATC**  
**451 TACTGCATGG CCCAGCTGCT GGACAACTCA GACACGGCTG AGCCCACGAA**  
**501 GGCTGGCCGG GGGCCTCTC AGCCGCCAC CCCCACCCT GCCTCGGATG**  
**551 CTTTTAGCG CAAGCTGGAG GGCTGCAGGT TCCTGCATGG CTACCATCGC**  
**601 TTCATGCACT CAGTGGGGCG GGTCTTCAGC AAGTGGGGGG AGAGCCCGAA**  
**651 CCGGAGCCGG AGACACAGCC CCCACCAGGC CCTGAGGAAG GGGGTGCGCA**  
**701 GGACCAGACC CTCCAGGAAA GGCAAGAGAC TCATGACCAG GGGACAGCTG**  
**751 CCCCAGGACGC GTGTTAA**

MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSEETL  
RGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNI  
YCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSK  
WGESPNSRR

**Fig. 2**



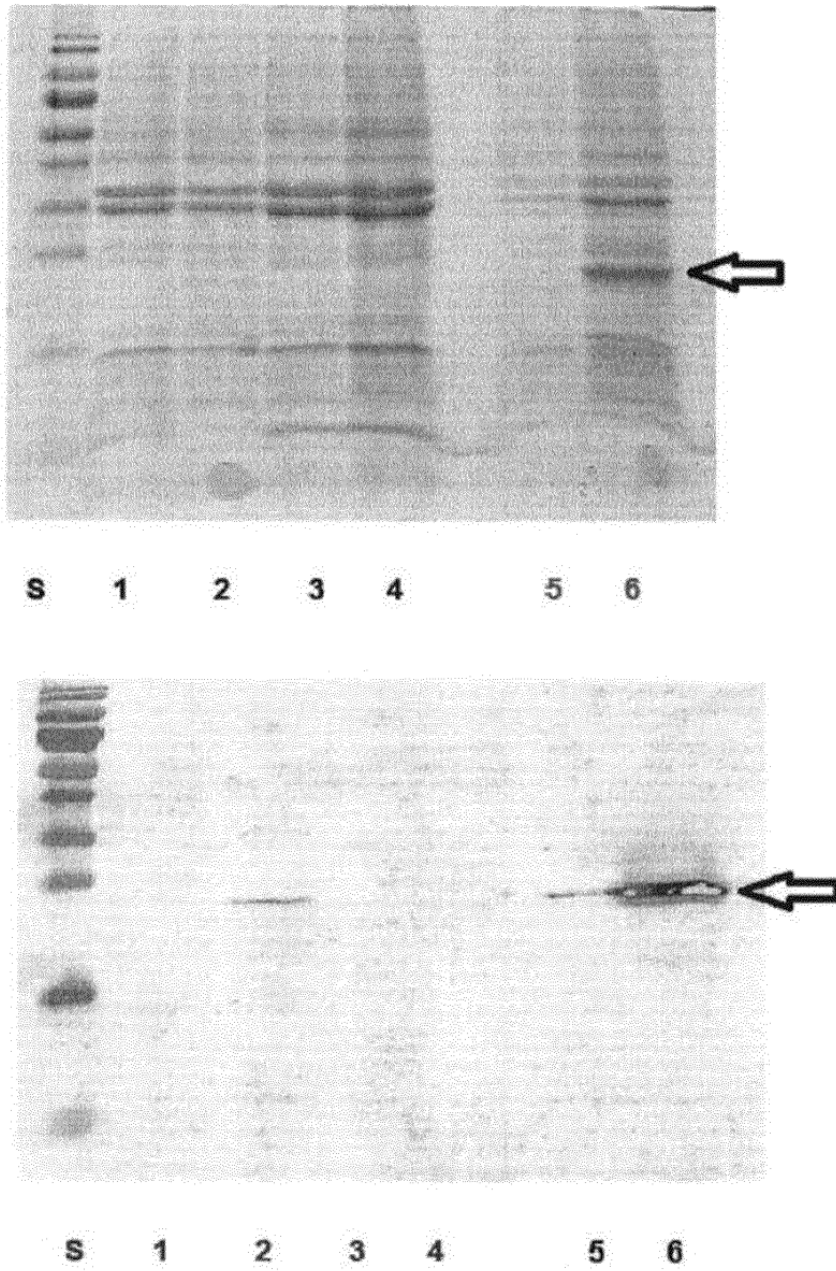


Fig. 3

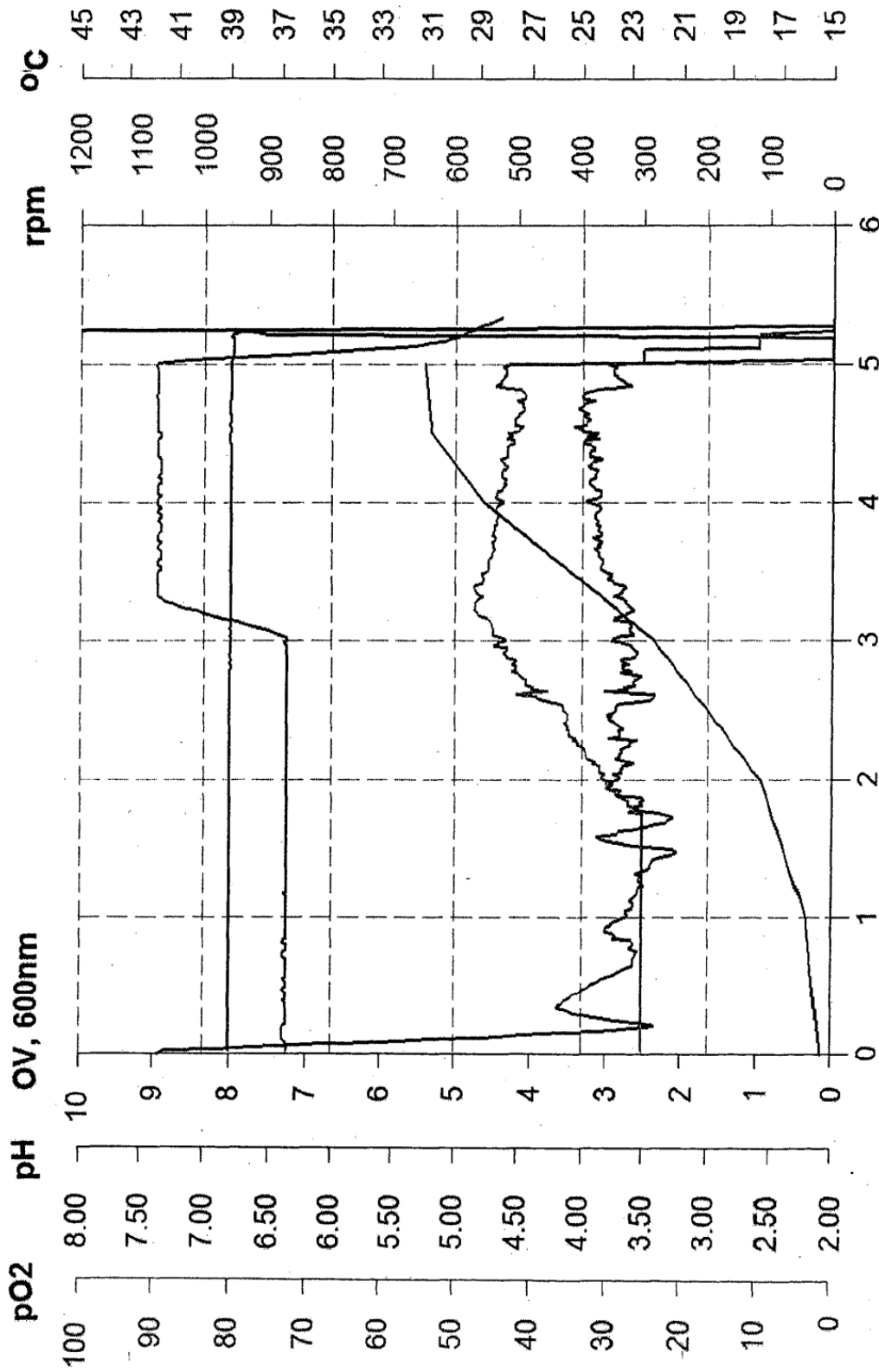
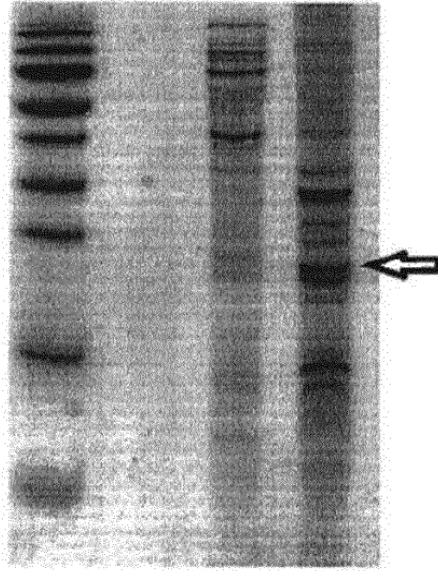
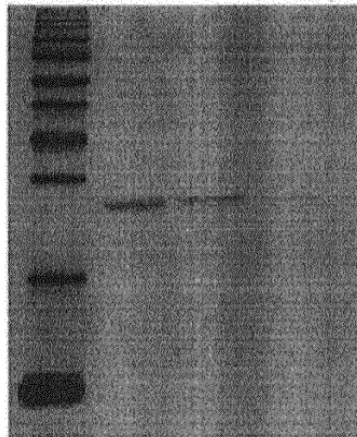


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

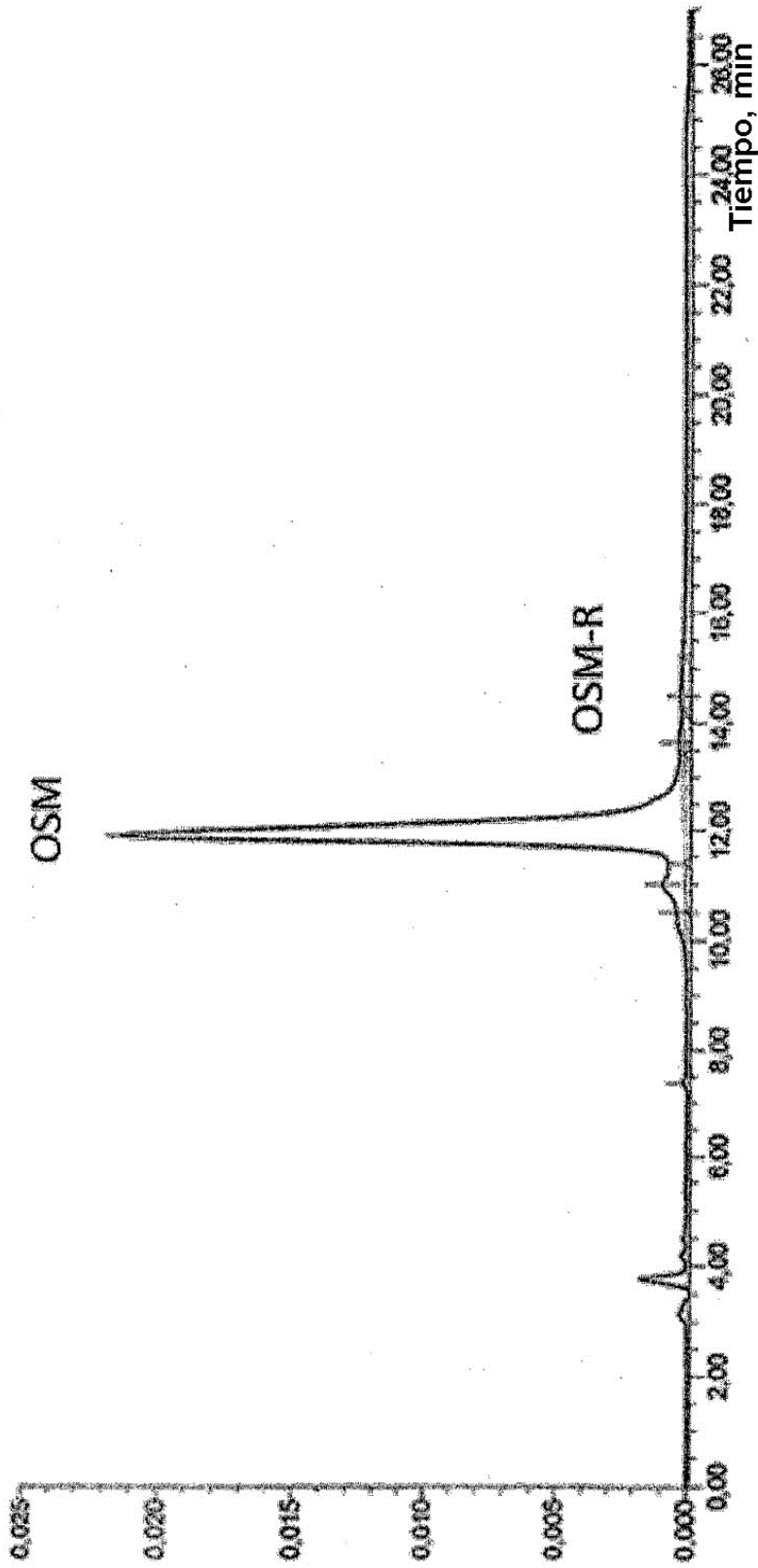


Fig. 7

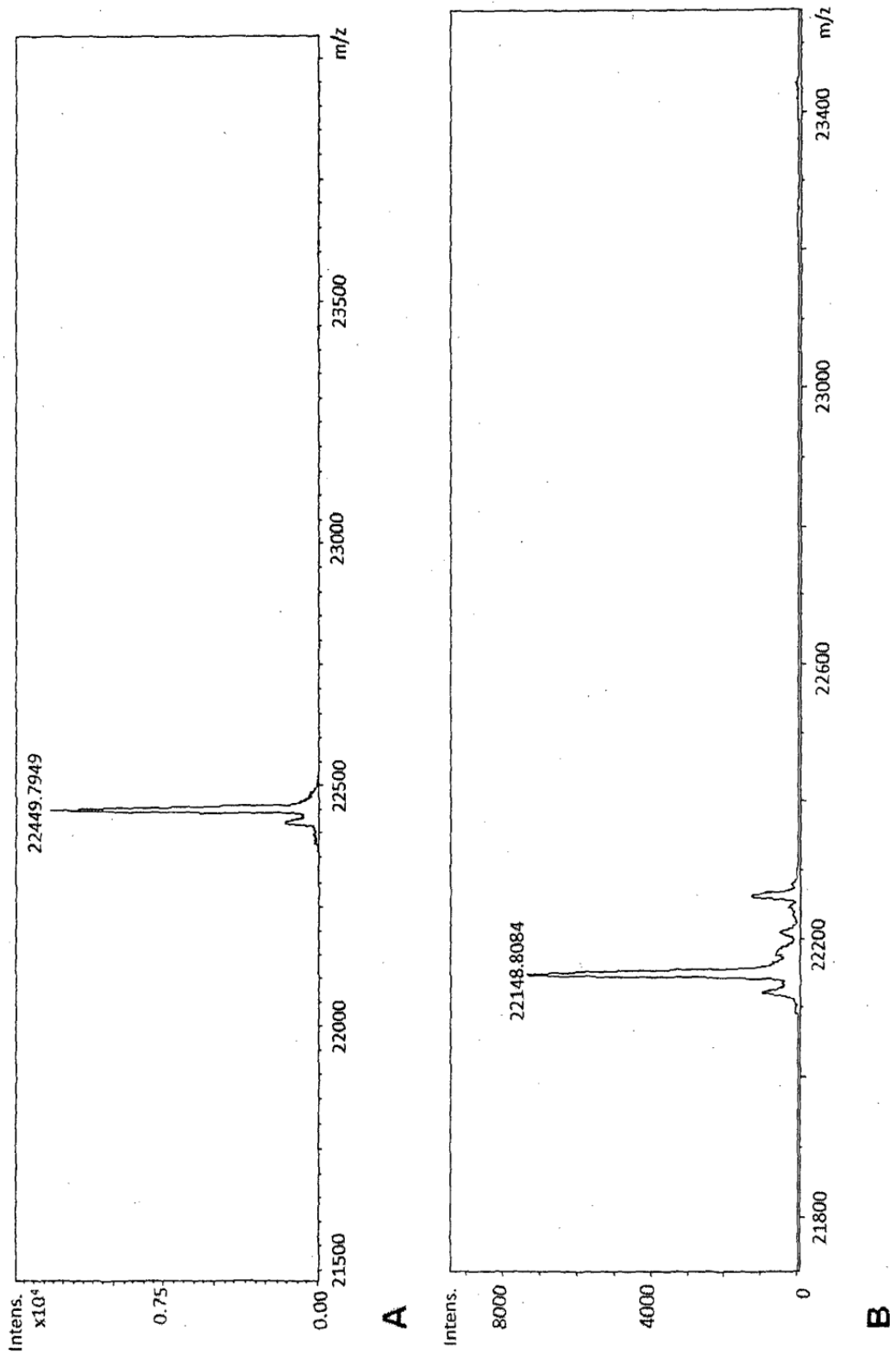


Fig. 8

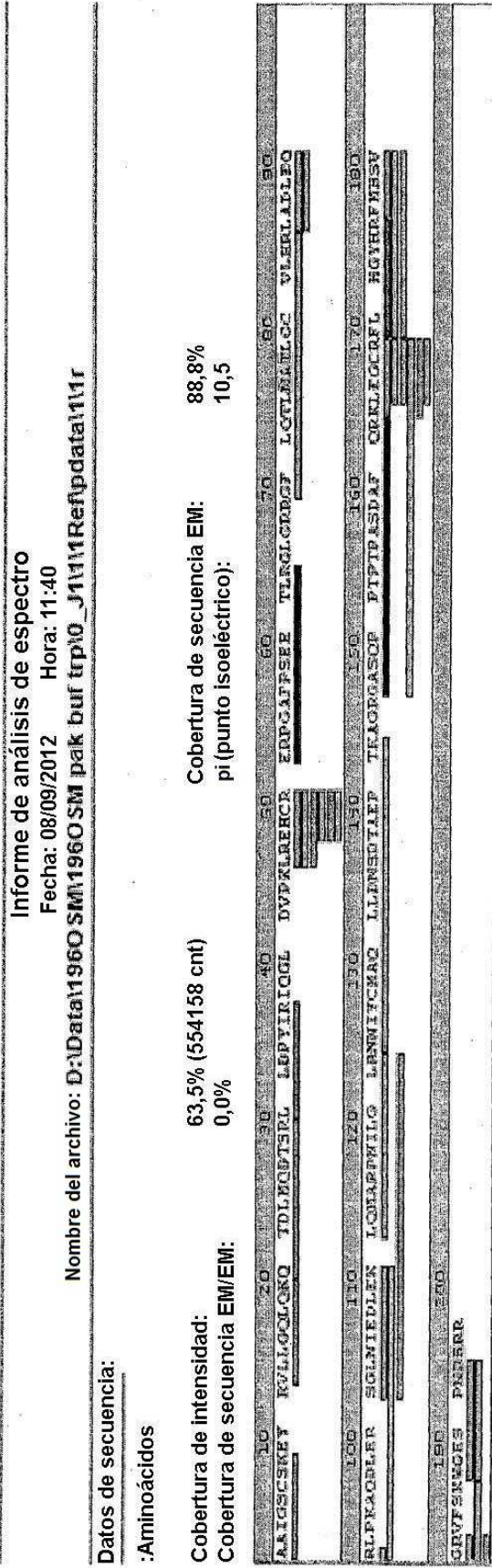


Fig. 9