

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 763**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2016 PCT/IN2016/000262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17081700**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2016 E 16825902 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3374376**

54 Título: **Procedimiento escalable industrialmente para recuperar proteínas transportadoras recombinantes biológicamente activas**

30 Prioridad:

09.11.2015 IN 6037CH2015

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

14.12.2020

73 Titular/es:

**BIOLOGICAL E LIMITED (100.0%)
18/1 & 3 Azamabad
Telangana, Hyderabad 500020, IN**

72 Inventor/es:

**GOEL,AKSHAY;
JOGLEKAR,TUSHAR;
TIWARI, KRISHNANAND;
MISHRA,YOGESH;
MANTENA,NARENDER, DEV y
DATLA,MAHIMA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 798 763 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

Procedimiento escalable industrialmente para recuperar proteínas transportadoras recombinantes biológicamente activas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de preparación que se realiza mediante la expresión de las proteínas transportadoras recombinantes en *Escherichia coli* y la purificación de las mismas. Más en particular, la invención se refiere a un procedimiento escalable industrialmente para la recuperación de proteínas transportadoras recombinantes.

10

Antecedentes de la invención

15

El papel de la proteína transportadora es mejorar la inmunogenicidad proporcionando epítomos de células T a través de presentación del MHC de clase II a células T auxiliares. Las proteínas transportadoras también aumentan la magnitud de la respuesta inmunitaria, así como engendran "memoria" de células B. El número de proteínas transportadoras usadas en vacunas autorizadas es relativamente limitado, que incluyen toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA). El acceso a proteínas transportadoras clínicamente probadas, seguras y eficaces es crítico para la investigación en el campo de vacunas conjugadas. Por tanto, la purificación de la forma nativa, soluble y funcional de proteínas transportadoras es una etapa muy importante y crucial en la producción de vacunas conjugadas. La ausencia de toxicidad y fuerte inmunogenicidad hace de las proteínas transportadoras tales como toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) un candidato robusto como transportador para inmunógenos deficientes como péptidos, oligosacáridos, polisacáridos e incluso ácidos nucleicos. Por tanto, debido a que dichas proteínas transportadoras están bien caracterizadas, se prefieren con respecto a otras proteínas transportadoras y, por tanto, se usan ampliamente en vacunas disponibles comercialmente.

20

25

30

El CRM₁₉₇, una forma mutante de DT, se aisló a principios de la década de 1970. También contribuyó a la comprensión de la estructura de la cadena A y B y a la función de DT. Uchida *et al.* describieron el aislamiento y las propiedades de varios mutantes, incluyendo CRM₁₉₇ (Uchida *et al.* 1973). El CRM₁₉₇ es un mutante de DT no tóxico que contiene un daño en la cadena A que bloquea la ribosilación de ADP. El CRM₁₉₇ resulta de un único cambio de base en el gen estructural que da como resultado la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 52. Es un polipéptido sencillo que consta de 535 aminoácidos y, en geles de SDS, esta proteína migra como una banda principal única de peso molecular aproximado de 58,4 kDa. Si bien el CRM₁₉₇ no muestra actividad enzimática (excepto endonucleasa), es inmunológicamente indistinguible de DT. El CRM₁₉₇ tiene la ventaja de ser una proteína bien definida al contrario que la toxina tratada con formaldehído (toxoides) que no está específicamente reticulada y sujeta a reordenamiento.

35

40

Aunque *Escherichia coli* es uno de los anfitriones más ampliamente usados para la producción de proteínas recombinantes, la expresión insoluble de proteínas heterólogas es un importante cuello de botella en la producción de estas proteínas recombinantes (Baneyx F, 1999; Peternel S *et al.*, 2011). Una ruta principal de pérdida de producto durante la etapa de plegamiento es la agregación. Estos agregados de proteínas o cuerpos de inclusión (IB) insolubles pueden usarse sólo después del replegamiento *in vitro* en la forma soluble que tiene su conformación nativa. Los cuerpos de inclusión de proteínas diferentes tienen características diferentes y requieren mucha optimización para replegar la proteína individual. En la mayoría de los casos, se observa una cantidad significativa de precipitación al replegar las proteínas (Singh SM *et al.*, 2005). Esto da como resultado una gran pérdida de rendimiento global de las proteínas diana, replegándose aproximadamente el 40% a una forma soluble y biológicamente activa. Se han descrito varios enfoques para el replegamiento *in vitro*; la mayoría de ellos implica el uso de aditivos para ayudar al plegamiento correcto. Estos aditivos o cosolutos desempeñan un papel importante en el proceso de replegamiento y pueden clasificarse según su función como supresores de agregación o potenciadores del plegamiento (Hamada H *et al.*, 2009).

45

50

La patente estadounidense n.º 4.961.969 divulga un procedimiento aprobado para la purificación y renaturalización de IFN- β producido por bacterias y biológicamente activo. El material parcialmente purificado obtenido por solubilización de cuerpos refringentes aislados de las células recombinantes se trata para obtener la reducción de la proteína en presencia de un entorno caotrópico y luego se oxida después de la retirada del agente reductor. Sin embargo, el ambiente caotrópico se mantiene durante la oxidación. Tras eliminar el entorno caotrópico, se suministra un aditivo de solubilización para mantener el IFN- β en disolución. También puede efectuarse una purificación adicional mediante medios convencionales.

55

60

La publicación de patente estadounidense n.º 2007/0027305 describe un método de recuperación de una proteína replegada, tal como el interferón β , que implica la solubilización de cuerpos de inclusión (IB) con reactivos caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina (GuHCl) 6 M o urea 8 M, el mezclado estático de una disolución concentrada de una proteína desnaturalizada con un diluyente de replegamiento para obtener la proteína replegada.

65

La publicación de patente estadounidense n.º 2015/0133636 describe un procedimiento para purificar una molécula diana de una muestra que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende la molécula diana y una o más impurezas; (b) añadir al menos un precipitante a la muestra y retirar una o más impurezas, para recuperar así una muestra clarificada; (c) someter la muestra clarificada de la etapa (b) a una etapa de cromatografía de unión y elución que comprende al menos dos unidades de separación, para obtener así un eluato que comprende la molécula diana; y (d) someter el eluato a purificación de flujo continuo que comprende el uso de dos o más medios; en el que al menos dos etapas se realizan simultáneamente durante al menos una duración de su parte, y en el que el procedimiento comprende una sola etapa de cromatografía de unión y elución. Se divulga además que el procedimiento comprende una etapa de inactivación de virus entre las etapas (c) y (d) anteriores, usando uno o más mezcladoras estáticas en línea.

Los métodos anteriores divulgaron la recuperación de proteínas, sin embargo, no existe ningún método específico divulgado para proteínas transportadoras tales como toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA). Por tanto, se requiere un método apropiado que minimice la pérdida con una pureza mejorada durante la etapa de replegamiento en la preparación de proteínas transportadoras.

A. Stefan *et al.* (J. Biotech. 2011, 156, 245-252) describen la sobreexpresión, el aislamiento y la purificación de CRM₁₉₇ variante de la toxina diftérica en *Escherichia coli*. El documento WO 2014/126884 A1 se refiere a métodos para replegar proteínas desnaturalizadas presentes en forma de cuerpos de inclusión a altos valores de pH, sin usar un agente de desnaturalización o caotrópico. El documento EP 1 845 103 A1 describe un método para replegar una proteína mezclando la proteína desnaturalizada con un tampón de replegamiento en condiciones de mezclado específicas. S. Singh *et al.* (J. Chem. Technol. Biotechnol. 2008, 83, 1126-1134) se refieren a la recuperación de proteínas a partir de cuerpos de inclusión de *Escherichia coli* por solubilización suave a un valor de pH alcalino. El documento WO 2007/016272 A1 describe un método para recuperar una proteína replegada que implica el mezclado estático de una disolución concentrada de una proteína desnaturalizada con un diluyente de replegamiento.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento escalable industrialmente para la preparación de proteínas transportadoras seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) que son útiles en la preparación de una vacuna.

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado adecuado para la producción a gran escala de proteínas transportadoras seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) que sea sencillo con bajo coste y alto rendimiento.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de proteínas transportadoras seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA), que comprende las etapas de:

a) transformación de *Escherichia coli* con el gen deseado que codifica para la proteína transportadora usando un vector plasmídico,

b) cultivo de la *Escherichia coli* transformada en medio de cultivo adecuado en condiciones adecuadas,

c) aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión,

d) desnaturalización y solubilización de cuerpos de inclusión a un valor de pH alto que oscila entre 9 y 14,

e) seguido por ajuste del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5 de la proteína solubilizada usando una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada,

f) purificación intermedia de la proteína replegada usando cromatografía de intercambio iónico para obtener la proteína transportadora nativa y > 90% pura y

g) purificación adicional de la proteína semipurificada obtenida en la etapa (f) mediante una o más separaciones cromatográficas usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales y colorantes, cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, cromatografía con hidroxipatita y cromatografía de exclusión molecular para obtener la proteína transportadora purificada.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de proteínas transportadoras recombinantes tal como se describe en el texto a continuación.

5 Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el texto a continuación.

Breve descripción de los dibujos:

10 Figura 1: cromatograma de intercambio iónico en el que la muestra de proteína replegada se cargó en una primera resina de intercambio aniónico a una velocidad de flujo de 150 - 300 cm por hora. La porción de lavado de las fracciones no retenidas y de las que están en equilibrio consiste en agregados y otras impurezas celulares. La etapa de elución se realiza para recuperar la diana replegada seguido por la regeneración de la columna. Esta cromatografía se usa como cromatografía de captura, en la que el eje de ordenadas representa la absorbancia a 280 (mUA) y el eje de abscisas representa el volumen de retención (ml).

15 Figura 2: el eluido del cromatograma de intercambio iónico de la primera cromatografía se concentra y se somete a diafiltración. Esta muestra de proteína se cargó en una segunda resina de intercambio aniónico a una velocidad de flujo de 150 - 300 cm por hora. La porción de lavado de las fracciones no retenidas y de las que están en equilibrio consiste en impurezas de bajo peso molecular y otras impurezas celulares restantes. La elución en gradiente lineal se realiza para recuperar el rCRM de la proteína de fusión seguido por la regeneración de la columna. Esta cromatografía se usa como cromatografía de purificación intermedia, en la que el eje de ordenadas representa la absorbancia a 280 (mUA) y el eje de abscisas representa el volumen de retención (ml).

20 Figura 3: el eluido del cromatograma de HIC de la segunda cromatografía se concentra y se somete a diafiltración. Esta muestra de proteína se cargó en una resina de interacción hidrófoba a una velocidad de flujo de 150 - 300 cm por hora. La porción de lavado de las fracciones no retenidas y de las que están en equilibrio consiste en endotoxinas, ácidos nucleicos de la célula huésped y las impurezas celulares restantes. La etapa de elución en gradiente se realiza para recuperar el rCRM seguido por la regeneración de la columna. Esta cromatografía se usa como cromatografía de pulido, en la que el eje de ordenadas representa la absorbancia a 280 (mUA) y el eje de abscisas representa el volumen de retención (ml).

25 Figura 4: se realizó análisis de SDS - reducción de SDS - PAGE para comprobar la pureza y el mellado cargando diversas cantidades de rCRM₁₉₇ purificado, en el que los carriles 8, 6, 4 y están en blanco. Los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 se cargan con rCRM₁₉₇ purificado con concentraciones crecientes (2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg y 10 µg). El marcador de proteína de bajo peso molecular (BioRad) se cargó en el carril 10.

30 Figura 5: inmunotransferencia de tipo Western de CRM₁₉₇ purificado, en la que el carril 1 se cargó con patrón de CRM₁₉₇ y el carril 3 se cargó con rCRM₁₉₇.

35 Figura 6: cromatograma de SEC - HPLC de CRM₁₉₇ purificado, en el que el eje de abscisas representa el tiempo de retención (min) y el eje de ordenadas las miliunidades de absorbancia (mUA) a 280 nm.

40 Figura 7: impacto del mezclado en línea sobre el replegamiento de rCRM₁₉₇. El eje de ordenadas representa el % de replegamiento y el % de agregación, y el eje de abscisas representa el tiempo en milisegundos.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a un procedimiento escalable industrialmente para la preparación de proteínas transportadoras seleccionadas de, pero no se limitan a, toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) en un huésped procarionta en el que la proteína diana se expresa como cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*, los cuerpos de inclusión se aíslan y se purifican y los cuerpos de inclusión purificados se desnaturalizan seguido por replegamiento tal como se define en las reivindicaciones. Se realiza purificación adicional usando separación cromatográfica para obtener las proteínas transportadoras nativas y puras.

50 La cepa de *Escherichia coli* usada se selecciona de, pero sin limitarse a, BL21DE3, Origami2, BL21A1, W3110, HMS174, C43, ER2566, MAX, B834.

55 Los cuerpos de inclusión son agregados de proteínas intracelulares refringentes observados habitualmente en bacterias tras la sobreexpresión de genes seleccionados como diana. En general, se usan agentes de solubilización y tampones de replegamiento para la solubilización de los cuerpos de inclusión y el replegamiento de la proteína, en los que el agente de solubilización se retira durante el replegamiento. El replegamiento de proteínas a partir de proteínas desnaturalizadas está influenciado por varios factores, incluyendo la solubilidad de la proteína, la retirada de desnaturalizante y la asistencia del replegamiento por un cosoluto o aditivos.

Los agentes caotrópicos son cosolutos que pueden alterar la red de unión de hidrógeno entre las moléculas de agua y reducir la estabilidad del estado nativo de las proteínas al debilitar el efecto hidrófobo. Por tanto, en la presente invención, la solubilización de los cuerpos de inclusión se lleva a cabo a un valor de pH alto que oscila entre 8 y 14 sin el uso de agente caotrópico que se asocia con desafíos como que son corrosivos, riesgo de manipulación de polvo en un área regulada, eliminación y gestión de residuos e impacto en la integridad de la proteína (carbamilación).

La solubilización de cuerpos de inclusión se lleva a cabo usando tampones seleccionados de carbonato, bicarbonato, Tris, borato, glicina y NaOH, preferiblemente tampón Tris. La concentración usada durante la solubilización de cuerpos de inclusión (IB) puede oscilar entre 50 y 200 mM.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de proteínas transportadoras en el que la etapa de replegamiento se ha optimizado usando una mezcladora estática en línea mediante ajuste rápido del pH sin usar tampones de replegamiento durante un periodo de 0,1 a 200 microsegundos.

Por consiguiente, la principal realización de la invención proporciona un procedimiento basado en cromatografía rentable, robusto, a escala industrial para la preparación de proteínas transportadoras recombinantes seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de un sistema de expresión procariota, en el que la proteína se expresa como cuerpos de inclusión, que comprende:

a. transformación de células bacterianas con el gen deseado que codifica para proteínas transportadoras usando un vector plasmídico,

b. cultivo de las células bacterianas transformadas en medios químicamente definidos complementados con glucosa como fuente de carbono en el que el pH se mantiene a 5-9 y a una temperatura de 20-40°C;

c. lisado de células bacterianas mediante medios mecánicos por encima de 800-1200 bar produciendo así un lisado que contiene cuerpos de inclusión y componentes celulares;

d. clarificación del lisado celular acuoso separando los sólidos de la disolución;

e. aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión (IB) usando tampones seleccionados de carbonato, bicarbonato, Tris, borato, glicina y NaOH para retirar los contaminantes celulares para formar un sedimento de IB purificados;

f. desnaturalización y solubilización de cuerpos de inclusión (IB) a un valor de pH alto que oscila entre 9 y 14 usando tampones seleccionados de tampón carbonato, bicarbonato, Tris, borato, glicina y NaOH;

g. ajuste rápido del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5, preferiblemente a 8, de proteínas transportadoras solubilizadas usando sistemas redox que contienen ácido y una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada,

h. purificación intermedia de la proteína replegada usando cromatografía de intercambio iónico para obtener la proteína transportadora nativa y > 90% pura e

i. purificación adicional de la proteína semipurificada obtenida en la etapa (h) mediante una o más separaciones cromatográficas usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales y colorantes, cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía de exclusión molecular para obtener la proteína transportadora purificada.

El ajuste rápido del pH de proteínas transportadoras solubilizadas se lleva a cabo usando ácidos orgánicos o inorgánicos como HCl, ácido ortofosfórico, ácido acético, ácido cítrico que contiene sistema redox similar a cisteína y cisteína, usando una mezcladora estática en línea, afectando así al replegamiento; en el que los cuerpos de inclusión purificados se desnaturalizan seguido por ajuste del pH de la proteína solubilizada usando una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada.

En una realización preferida, se usa HCl para el ajuste rápido del pH durante la etapa de replegamiento (g) y la concentración de HCl puede oscilar entre 100 y 500 mM y la de cisteína puede oscilar entre 2 y 20 M y la de cisteína entre 1 y 10 M.

En una realización de la presente invención, la etapa de replegamiento se lleva a cabo usando una mezcladora estática mediante ajuste rápido del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5, preferiblemente a 8, en microsegundos, en la que el pH es el factor más crítico que no tiene una influencia significativa sobre la concentración de proteína diana durante el replegamiento.

El replegamiento puede realizarse a una temperatura en el intervalo de 2 a 10°C, preferiblemente, a 4°C. La razón de

dilución del HCl y los cuerpos de inclusión puede mantenerse constante o la razón de dilución puede seleccionarse de desde 0 hasta 5: 1 hasta 5.

5 En una realización de la presente invención, se lleva a cabo el uso de una baja dilución en el intervalo de pH de 6 a 8,5 durante la etapa de replegamiento, lo que proporciona grandes ventajas en los requisitos de la instalación y, por tanto, hace que el procedimiento sea económico.

10 En otra realización, los cuerpos de inclusión purificados se renaturalizaron seguido por ajuste del pH de la proteína solubilizada usando una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada. Los cuerpos de inclusión mencionados anteriormente se solubilizaron en tampón Tris 100 mM. El pH de los cuerpos de inclusión solubilizados se ajustó a 8 mediante HCl 300 mM que contenía cisteína de 2 a 20 mM y cistina de 1 a 10 mM. La temperatura de todas las disoluciones se mantiene entre 0 - 6°C.

15 El CRM₁₉₇ purificado preparado según la presente invención cumple todas las especificaciones tal como se indican en la tabla I a continuación.

Tabla I

n.º de S	Descripción	Especificaciones
1	Identidad	Inmunotransferencia de tipo Western: una banda inmunorreactiva principal de masa 58 kD ± el 10% (figura 5)
2	Pureza	SDS PAGE; el 90% de NLT de CRM ₁₉₇ (figura 4)
3	CRM mellado (cadena A y B)	SDS PAGE: gel reductor de azul de Coomassie; el 10% del contenido de NMT (total) de la cadena A y B del CRM ₁₉₇ total (figura 4)
4	SEC - HPLC de dímero/peso mol. superior	El 15% de NMT (figura 6)
5	Endotoxina	100 UE de NMT/100 ug

20 En aún otra realización de la invención, la purificación mediante cromatografía se lleva a cabo usando cromatografía de una sola etapa o de múltiples etapas seleccionada de i) intercambio iónico directo seguido por intercambio iónico seguido por cromatografía de interacción hidrófoba y ii) intercambio iónico seguido por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Además, dicha cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico. Las resinas de intercambio aniónico se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, DEAE celulosa, MonoQ, Cpto Q, Eshmino Q, Gigacap Q 650M, Nuvia-Q, Cellufine Q-h, MiniQ, Source 15Q y 30Q, Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose high Performance, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare), UNOsphere Q, Macro-Prep DEAE y Macro-Prep High Q de Biorad, Ceramic HyperD Q, ceramic HyperD DEAE, Toyopearl SuperQ-650S, 650M y 650C, QAE-550C y 650S, DEAE-650M, y similares.

30 La columna de intercambio aniónico se eluye a del 10 al 60% de NaCl 1 M en tampón Tris - HCl y la concentración del tampón puede oscilar entre 10 mM y 300 mM. La columna de intercambio aniónico opera en el intervalo de pH de 6 a 9, preferiblemente de 8 a 9.

35 El soporte de cromatografía de interacción hidrófoba se selecciona del grupo, pero sin limitarse a, butil-, fenil-, octil-agarosa, resina polimérica orgánica de butilo, fenilo, éter, y fenil-Sepharose, y similares.

La columna de cromatografía de interacción hidrófoba opera en el intervalo de pH de 5 a 8, preferiblemente de 6 a 7,6.

40 El tampón usado para la cromatografía de interacción hidrófoba puede ser fosfato de sodio o potasio que contiene cloruro de sodio que oscila entre 2 M y 5 M de concentración o sólo sal de sulfato de sodio entre 2 M y 3 M de concentración.

45 En la realización específica, la proteína transportadora es CRM₁₉₇ y el rendimiento de CRM₁₉₇ soluble es de aproximadamente 0,01 g/l, 0,1 g/l, 0,25 g/l, 0,5 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 1,5 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 2,5 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 3,5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 4,5 g/l, aproximadamente 4,5 g/l, aproximadamente 5 g/l.

50 En otra realización específica, la proteína transportadora es CRM₁₉₇ y el rendimiento de CRM₁₉₇ insoluble es de aproximadamente 0,1 g/l, 0,25 g/l, 0,5 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 1,5 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 2,5 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 3,5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente

4,5 g/l, aproximadamente 4,5 g/l, aproximadamente 5 g/l.

Por tanto, la invención implica más de una etapa de purificación posterior, y también explota el valor de pI de CRM₁₉₇ en una etapa cromatográfica de intercambio iónico, mediante lo cual se separa de otras proteínas contaminantes. Finalmente, la cantidad de CRM₁₉₇ se cuantificó mediante el ensayo de BCA/Bradford/Lowry y se visualizó en gel de acrilamida al 10-12% (SDS-PAGE). La identificación de polipéptido se realiza mediante inmunotransferencia de tipo Western e inmunoensayos similares. La pureza e integridad del polipéptido purificado se mide mediante métodos de SDS-PAGE y HPLC. El rendimiento de la proteína así expresado fue de 500-3000 mg/l del medio de cultivo y puede variarse posteriormente modulando los aditivos y las condiciones del cultivo, así como las etapas de purificación. El método de la invención proporciona un método aplicable industrialmente de ajuste del tiempo de inducción y, posteriormente, la modulación del pH y la temperatura de las etapas cromatográficas proporciona un método sencillo, económico y no laborioso. Excluye la necesidad de extensivas etapas que implican la preparación de tampones o un kit o una disolución de trabajo de los mismos.

En la realización particular, el polipéptido CRM₁₉₇ purificado carecía fácilmente del primer aminoácido Met, cuya presencia no se desea en la proteína CRM₁₉₇ final y cuya eliminación conlleva la necesidad de etapas de purificación adicionales. El polipéptido así obtenido está en forma activa y nativa; carece fácilmente de la metionina no deseada como primer aminoácido sin la necesidad de etapas adicionales. La secuencia de aminoácidos de CRM₁₉₇ se analizó *in silico* mediante herramientas bioinformáticas; mostró aproximadamente el 38,4% de hidrofobicidad en la proteína. El punto isoeléctrico de CRM₁₉₇ se encontró que era de aproximadamente 5,81. La proteína CRM₁₉₇ contenía 4 residuos de aminoácido de cisteína y 21 residuos de prolina. El repliegamiento del polipéptido se confirma mediante ensayos funcionales midiendo la actividad de endonucleasa sobre ADN. La confirmación biofísica se realizó mediante análisis de dicroísmo circular (CD) del polipéptido y se comparó con polipéptidos disponibles comercialmente.

Las proteínas transportadoras preparadas según la presente invención se usan para conjugarse con moléculas de polisacáridos aisladas de *Pneumococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Meningococcus*, *Streptococcus pneumoniae* y otras bacterias patógenas.

En otra realización, las proteínas transportadoras preparadas según la presente invención se usan como un transportador conjugado para vacunas tales como aquellas contra *Pneumococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Meningococcus*, *Streptococcus pneumoniae* y otras bacterias patógenas.

El procedimiento de la presente invención no requiere agentes caotrópicos ni tampones de repliegamiento (métodos basados en dilución clásica), que hacen que el procedimiento sea sencillo y comercialmente viable.

Puede lograrse una cantidad muy alta y una forma pura de proteínas transportadoras mediante el procedimiento divulgado e ilustrado en el presente documento.

Las proteínas transportadoras preparadas según el procedimiento de la presente invención son económicas y requieren menos tiempo.

La presente invención se ilustra más específicamente con referencia a los ejemplos dados a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada por un ejemplo en modo alguno, pero incluye otras proteínas transportadoras y variaciones de las mismas dentro de los parámetros descritos en el presente documento, tal como pueden conocer los expertos en la técnica.

Ejemplo I:

Etapa (i): síntesis de gen de CRM₁₉₇:

Se optimizó un gen de CRM₁₉₇ de longitud completa según el uso de codones de *Escherichia coli*. Se usaron los siguientes parámetros para la optimización de genes de CRM₁₉₇: sesgo en el uso de codones, contenido de GC, estructura secundaria de ARNm, patrones deseados personalizados, patrones no deseados personalizados, secuencias de repetición (repetición directa, repetición inversa y repetición en díadas), sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (delección o inserción).

El gen de CRM₁₉₇ optimizado se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector plasmídico pUC57 usando los sitios de restricción BamHI y SapI, generando pUC57_CRM₁₉₇. Los vectores que contienen gen de CRM₁₉₇ se transformaron en el huésped DH5 α de *Escherichia coli* y los clones se seleccionaron sobre una placa de LB + kanamicina. La presencia y corrección del gen de CRM₁₉₇ en pUC57 se confirmó mediante digestión por restricción del plásmido pUC57_CRM₁₉₇ por Age I (ubicada en el gen de CRM₁₉₇) y Nde I (ubicada en el plásmido pUC57). Además, la secuencia de CRM₁₉₇ se confirmó mediante PCR y secuenciación de ADN.

Etapa (ii): inserción de CRM₁₉₇ en el vector de expresión pTWIN1

Se hizo crecer durante la noche DH5 α de *Escherichia coli* que portaba pUC57_CRM₁₉₇ en LB + kanamicina en un

volumen de 50 ml. Se centrifugaron las bacterias y se usó el sedimento para el aislamiento del plásmido. El aislamiento del plásmido se realizó usando el kit de minipreparación de plásmidos de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido aislado se cuantificó mediante NanoDrop.

5 Se escindió CRM₁₉₇ de pUC57, se digirieron 5 µg de plásmido con las endonucleasas de restricción BamHI y SapI. Se desarrolló el plásmido digerido en gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente al gen de CRM₁₉₇ se purificó usando el kit de extracción de gel de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los 5 µg del plásmido de expresión pTWIN1 también se digirieron con BamHI y SapI para generar sitios de restricción que sean compatibles con el gen de CRM₁₉₇. También se purificó el pTWIN1 digerido del gel usando el kit de extracción de gel de Qiagen con las instrucciones del fabricante.

10 El gen de CRM₁₉₇ digerido se ligó en pTWIN1 usando el kit de ligación de ADN basado en ligasa T4 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron el vector (pTWIN1) y el inserto (CRM₁₉₇) en una razón 1:3, 1:4, 1:5 en presencia de ADN ligasa T4 y tampones en un volumen de reacción de 20 µl. Se incubó durante la noche la mezcla de ligación a 16°C. A la mañana siguiente, se añadieron/transformaron 5 µl de mezcla de ligación en huésped de expresión BL21-DE3 de *Escherichia coli*. El BL21 se transformó usando el protocolo de transformación química. Se incubaron las células de BL21 positivas para la ligación en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación, se administró un choque térmico durante 45 segundos a 42°C. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se añadieron 500 µl de medio SOC. Se incubó el tubo con transformantes durante 2 horas a 37°C con 200 rpm. De la misma, se sembraron en placa 100 µl de mezcla en una placa de LB+ampicilina para el cribado de transformantes.

15 A la mañana siguiente, se seleccionaron los transformantes BL21-DE3 de expresión de CRM₁₉₇ de placas de caldo Luria+ampicilina. De estos, se seleccionaron 5 clones que se hicieron crecer en caldo Luria+ampicilina y se hicieron crecer en 10 ml de medio de caldo Luria+ampicilina durante la noche a 37°C, 200 rpm. Se centrifugó el cultivo y se extrajo el plásmido del sedimento celular usando el kit de extracción de plásmidos de Qiagen.

20 Para verificar la corrección del clon, se digirieron 2 µg de plásmido con endonucleasa de restricción Agel y Apal, respectivamente. El sitio de Agel está presente en CRM₁₉₇ y el de Apal está en pTWIN1. Por tanto, se usó doble digestión con ambas enzimas para la confirmación del clon correcto. El clon se designó como pTWIN1_CRM₁₉₇ (BL21-DE3). Además, los clones se confirmaron mediante PCR usando cebadores específicos de genes de CRM₁₉₇ y secuenciación de ADN. La reserva de glicerol de BL21 que expresa CRM₁₉₇ se elaboró haciendo reaccionar bacterias en 10 ml de caldo Luria+ampicilina durante la noche. A la mañana siguiente, se añadió glicerol esterilizado al 40% al cultivo y se dispensó en alícuotas de 1 ml en un criovial. Se almacenaron los viales a -80°C para su posterior uso en el análisis de expresión.

25 Etapa (iii): confirmación de la expresión de CRM₁₉₇:

30 El clon BL21 almacenado a -80°C se cultivó en línea en una placa de caldo Luria+ampicilina. Se incubó la placa durante la noche a 37°C. Se recogió una colonia individual y se inoculó en 50 ml de medio de caldo Luria+ampicilina en un matraz de 150 ml. Se incubó el matraz a 37°C, 200 RPM hasta DO600 = 1. Una vez que la DO alcanza el punto deseado, se extrajeron 5 ml de cultivo que se usa como cultivo no inducido. Se mantuvo el cultivo no inducido en hielo hasta su uso. Para inducir la expresión de CRM₁₉₇, se añadió IPTG 0,5 mM al cultivo restante de 45 ml y se incubó adicionalmente el matraz durante 4 horas adicionales a 30°C y rotación de 200 rpm. Se recogió el cultivo inducido después de 4 horas y se examinó la expresión de CRM₁₉₇ mediante SDS-PAGE (figura 1) e inmunotransferencia de tipo Western (figura 2).

35 Para el análisis de SDS-PAGE, se tomó 1 ml de cultivo de cultivo inducido y no inducido (ambos normalizados para DO600 = 1) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó el tubo y se resuspendió el sedimento en 50 µl de PBS. En esta suspensión se añadieron 50 µl de tampón de carga de SDS-PAGE con agente reductor (2x). Se hirvió la mezcla a 100°C durante 5 min. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se cargaron 20 µl de cultivo no inducido e inducido en el gel de Tris-glicina al 4-12%. Se desarrolló el gel durante 1,5 horas a 150 voltios. Se retiraron los geles y se incubaron en colorante azul brillante de Coomassie durante 1 hora. Después de la tinción, se detuvo el gel en una disolución de eliminación de la tinción que contenía metanol al 40% = ácido acético al 10% durante 3 horas. Se visualizó la expresión de CRM₁₉₇ como proteína de ~58 kD que sólo es visible en el cultivo inducido. Para la inmunotransferencia de tipo Western, se desarrolló un conjunto separado de gel de la misma manera que el SDS-PAGE y el gel se transfirió sobre PVDF (membrana de poli(fluoruro de vinilideno)). Se sometió a inmunotransferencia la membrana mediante anticuerpo anti-CRM₁₉₇. En la inmunotransferencia de tipo Western, CRM₁₉₇ apareció como una única banda inmunorreactiva a ~58 kD. No se observó ninguna banda específica de CRM₁₉₇ en el cultivo no inducido. Este experimento confirma que el clon generado en el presente estudio puede expresar la proteína rCRM₁₉₇. Estos clones se usaron además para la producción y la purificación a gran escala de CRM₁₉₇.

40 Etapa (iv): preparación de cuerpos de inclusión

45 Se inoculó un vial de un ml de células BL21 de *Escherichia coli* en 50 ml de medio LB+Amp y se hicieron crecer durante la noche a 37°C, 200 rpm. Se realizó la fermentación a escala de 20 l. Se inocularon las células de *Escherichia coli* al

fermentador y se hicieron crecer a 30°C. Se indujo el cultivo con IPTG 0,5 mM a DO600 = 20. Después de 12 horas tras la inducción, se recogió el cultivo de fermentación y se preparó el sedimento celular mediante centrifugación. Se lisó el sedimento celular de manera mecánica en un homogeneizador. Se aisló el cuerpo de inclusión (que contiene la proteína CRM₁₉₇ deseada) mediante centrifugación de lisados celulares. Se descartó el sobrenadante y se retuvo el sedimento que contiene el cuerpo de inclusión (IB). Los cuerpos de inclusión aislados se purifican usando tres tampones de lavado, en los que el primero contenía Tris 20 mM + NaCl 250 mM, el segundo contenía Tris 20 mM + urea 2 M + Triton X-100 al 1% y el tercero contenía Tris 20 mM para obtener cuerpos de inclusión de rCRM purificados.

Ejemplo II

Se desnaturalizaron 100 g de cuerpos de inclusión de proteína CRM₁₉₇ mediante un pH alto, se disolvieron mediante agitación a 120 minutos, se clarificaron mediante centrifugación durante 40 minutos, se recogió el sobrenadante y se clarificó adicionalmente mediante un filtro de 0,8 - 0,45 μ. En el que dicha disolución de desnaturalización contenía Tris 100 mM, pH 12,0. Se realizó el replegamiento ajustando el pH a 8 usando HCl 100 - 250 mM que contenía cistina 10 mM, cisteína 20 mM, pH 2,0 sin ninguna dilución haciéndola pasar a través de una mezcladora estática (Sulzer y Koflow son los dos fabricantes de la mezcladora estática en línea) durante <10 milisegundos.

Una columna de intercambio aniónico (Capto Q, primera etapa de intercambio aniónico) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 se puso en contacto con una disolución de proteína replegada, seguido por elución con tampón de NaCl 20 – 50 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

El eluido de proteínas se sometió a una etapa de UF/DF de 10 kDa (1ª UF/DF) para eliminar la sal y concentrar la disolución de proteínas.

El eluido de proteínas concentrado y diafiltrado anterior se puso en contacto con una segunda columna de intercambio aniónico (Source 30Q) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, seguido por elución en gradiente lineal con tampón de NaCl 10 – 15 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

El eluido de proteínas se sometió a una etapa de UF/DF de 10 kDa (2ª UF/DF) para eliminar la sal y concentrar la disolución de proteínas.

El eluido de proteínas concentrado y diafiltrado anterior se tonificó con NaCl 3 M añadiendo NaCl sólido calculado y poniéndolo en contacto con una columna de interacción hidrófoba (fenil Sepharose FF) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 8,0, seguido por elución con tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,2.

El eluido de proteínas se sometió a una etapa de UF/DF de 10 kDa (1ª UF/DF) para eliminar la sal y concentrar la disolución de proteínas. La disolución de proteínas se sometió a diafiltración con tampón de fosfato de potasio 10 mM, sacarosa al 5%, pH 7,2.

El eluido de proteínas concentrado y diafiltrado se filtró a través de 0,22 μ y se congeló a -70°C.

La purificación intermedia de la proteína replegada (figura 1) usando cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo para obtener la proteína transportadora nativa y > 90% pura, y la proteína semipurificada obtenida como resultado de la purificación intermedia se sometió a separación cromatográfica adicional (figura 2 y 3) para obtener proteínas transportadoras purificadas.

Se evaluó el impacto del tiempo de mezclado sobre el pH para el replegamiento de rCRM₁₉₇. Se realizó el replegamiento basado en el pH a 4°C, se mantuvo constante la razón de dilución. Se cambió el tiempo de mezclado desde 2000 milisegundos hasta 60 milisegundos usando una mezcladora estática en línea. La tabla II muestra que el impacto de la reducción en el tiempo de mezclado es directamente proporcional al % de replegamiento de rCRM.

Tabla II - Impacto del mezclado en línea sobre el replegamiento de rCRM₁₉₇ (figura 7)

n.º de S.	Dilución en veces	Tiempo de mezclado (milisegundos)	% de agregación	% de replegamiento de rCRM
1	1,5x	60	30	38
2	1,5x	80	46	30
3	1,5x	120	52	26
4	1,5x	240	55	22
5	Mezclado tradicional	2000	77	11

Los parámetros de replegamiento del CRM₁₉₇ preparado según el procedimiento descrito anteriormente se comparan con los del CRM₁₉₇ preparado según el procedimiento de replegamiento convencional descrito en el presente documento.

5 Las proteínas a base de cuerpos de inclusión se solubilizan usando sales caotrópicas. El replegamiento se realiza reduciendo la concentración de la sal caotrópica, esto se logra mediante dilución (por encima de 100 veces). La dilución da como resultado la reducción de las concentraciones de proteínas por debajo de 200 microgramos/ml. El replegamiento basado en dilución convencional no es viable en la fabricación a gran escala debido a la necesidad de recipientes de replegamiento a escala muy grandes.

10 La comparación del procedimiento de replegamiento convencional con el procedimiento de la presente invención se presenta en la tabla III a continuación.

15 Tabla III

Parámetros	Procedimiento de replegamiento convencional	Procedimiento de la presente invención
Conc. de proteína diana (mg/ml)	~ 0,2	~ 5
Dilución requerida	~ 40X	~ 1,5X
Volumen de replegamiento	~ 40 l	~ 1,5 l
Requisito de instalación	Recipientes de gran volumen	Bajos volúmenes
Tiempo de procesamiento adicional	Muy alto	Tiempo de procesamiento mínimo

Se han preparado diversos lotes de CRM₁₉₇ con condiciones similares descritas en el ejemplo 2. El rendimiento de CRM₁₉₇ se obtuvo a partir de 3 lotes diferentes. Los datos divulgados en la tabla IV indican la consistencia en el replegamiento.

20 Tabla IV - Rendimiento de rCRM₁₉₇

N.º de lote	Contenido de rCRM ₁₉₇ en cuerpos de inclusión (mg/l)	% de replegamiento	Productividad de CRM ₁₉₇ replegado y purificado (mg/l)
TD/CRM/CRM-P/012-002/15	2400	19,4	340
TD/CRM/CRM-P/013-004/15	2200	17,49	347
TD/CRM/CRM-P/013-005/15	2900	18,2	342

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de proteínas transportadoras seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA), que comprende las etapas de:
 - a) transformación de *Escherichia coli* con el gen deseado que codifica para la proteína transportadora usando un vector plasmídico,
 - b) cultivo de la *Escherichia coli* transformada en medio de cultivo adecuado en condiciones adecuadas,
 - c) aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión,
 - d) desnaturalización y solubilización de cuerpos de inclusión a un valor de pH alto que oscila entre 9 y 14,
 - e) seguido por ajuste del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5 de la proteína solubilizada usando una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada,
 - f) purificación intermedia de la proteína replegada usando cromatografía de intercambio iónico para obtener la proteína transportadora nativa y > 90% pura y
 - g) purificación adicional de la proteína semipurificada obtenida en la etapa (f) mediante una o más separación cromatográfica usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales y colorantes, cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, cromatografía con hidroxapatita y cromatografía de exclusión molecular para obtener la proteína transportadora purificada.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ajuste del pH es a 8.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína transportadora es material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇) y en el que el gen deseado que codifica para la proteína transportadora en la etapa a) es el gen que codifica para CRM₁₉₇, la proteína semipurificada obtenida en la etapa (f) es CRM₁₉₇ nativo >90% puro y la proteína transportadora purificada obtenida en la etapa g) es CRM₁₉₇ purificado.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, en el que la etapa de replegamiento e) se ha optimizado usando una mezcladora estática en línea mediante ajuste rápido del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5 durante un periodo de 1 a 200 microsegundos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el ajuste rápido del pH es a 8.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que el procedimiento no implica el uso de tampones de replegamiento y se optimiza usando una mezcladora estática en línea mediante ajuste rápido del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5 durante un periodo de 10 a 200 microsegundos.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el ajuste rápido del pH es a 8.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la solubilización de cuerpos de inclusión se lleva a cabo a un valor de pH alto que oscila entre 9 y 14 sin el uso de agente caotrópico.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento de CRM₁₉₇ insoluble es de desde aproximadamente 0,01 hasta 5 g/l.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento de CRM₁₉₇ soluble es de desde aproximadamente 0,01 hasta 5 g/l.
11. Procedimiento para la preparación de proteínas transportadoras recombinantes seleccionadas de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada 197 (CRM₁₉₇), proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteína de la membrana exterior de *Neisseria*, toxina pertúsica (PT), pertactina (PRN) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de un sistema de expresión procariota, en el que la proteína se expresa como cuerpos de inclusión, que comprende:
 - a. transformación de células bacterianas con el gen deseado que codifica para proteínas transportadoras usando un vector plasmídico,
 - b. cultivo de las células bacterianas transformadas en medios químicamente definidos complementados con

glucosa como fuente de carbono en el que el pH se mantiene a 5-9 y a una temperatura de 20-40°C;

5 c. lisado de células bacterianas mediante medios mecánicos por encima de 800-1200 bar produciendo así un lisado que contiene cuerpos de inclusión y componentes celulares;

d. clarificación del lisado celular acuoso separando los sólidos de la disolución;

10 e. aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión (IB) usando tampones seleccionados de carbonato, bicarbonato, Tris, borato, glicina y NaOH para retirar los contaminantes celulares para formar un sedimento de IB purificados;

f. desnaturalización y solubilización de cuerpos de inclusión (IB) a un valor de pH alto que oscila entre 9 y 14 usando tampones seleccionados de tampón carbonato, bicarbonato, Tris, borato, glicina y NaOH;

15 g. ajuste rápido del pH dentro de un intervalo de 6 a 8,5 de proteínas transportadoras solubilizadas usando sistemas redox que contienen ácido y una mezcladora estática en línea durante un periodo de 0,1 a 200 ms, para producir la proteína replegada,

20 h. purificación intermedia de la proteína replegada usando cromatografía de intercambio iónico para obtener la proteína transportadora nativa y > 90% pura e

25 i. purificación adicional de la proteína semipurificada obtenida en la etapa (h) mediante una o más separaciones cromatográficas usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales y colorantes, cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, cromatografía con hidroxapatita y cromatografía de exclusión molecular para obtener la proteína transportadora purificada.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el ajuste rápido del pH es a 8.

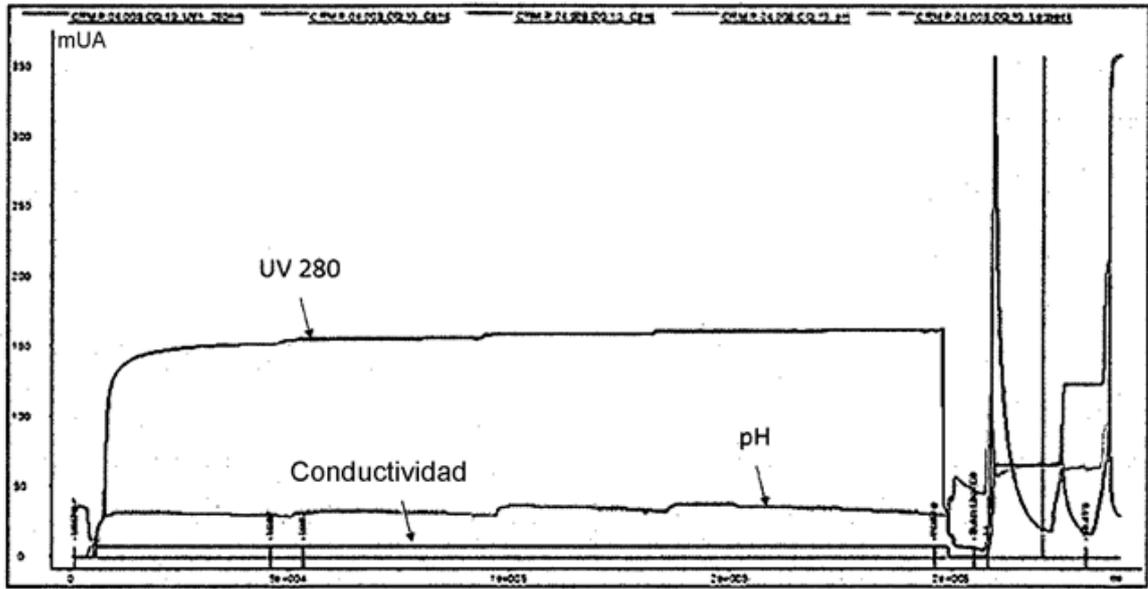


FIGURA 1

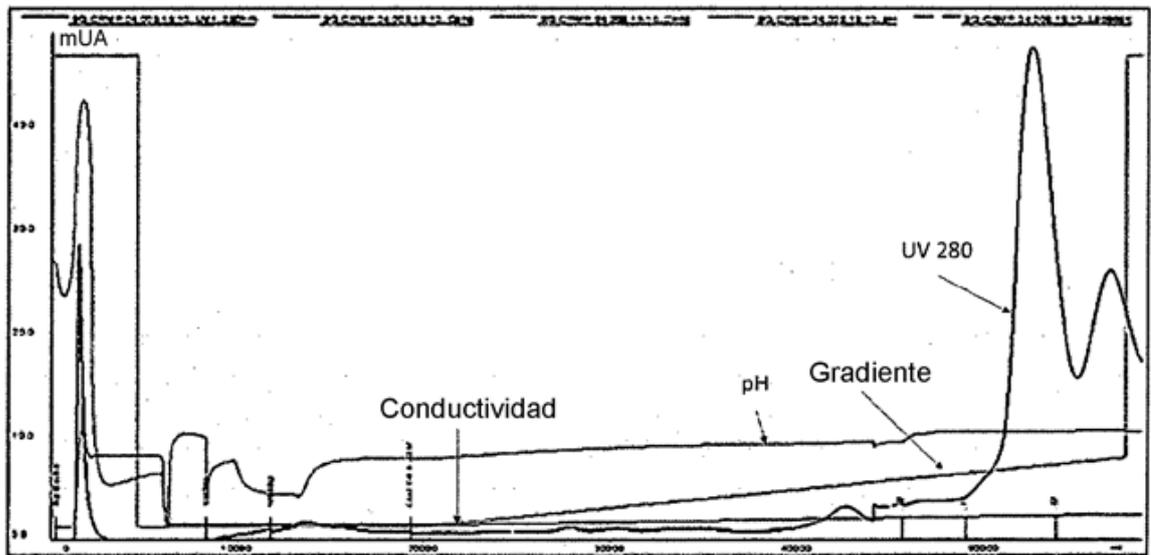


FIGURA 2

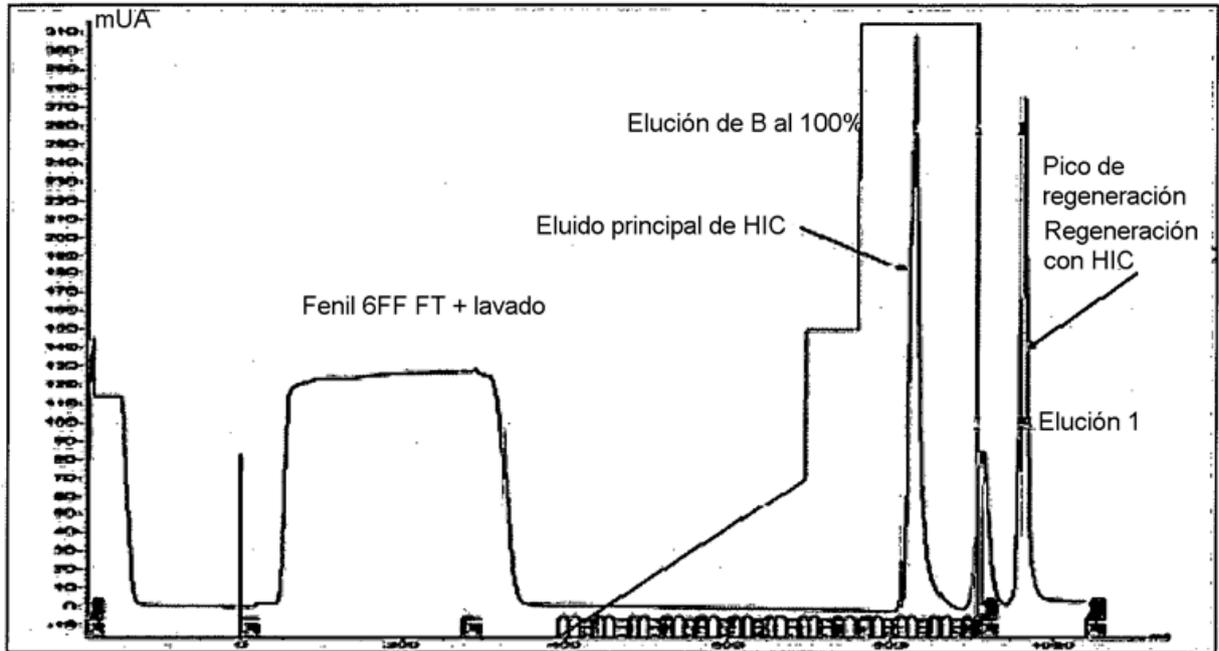


FIGURA 3

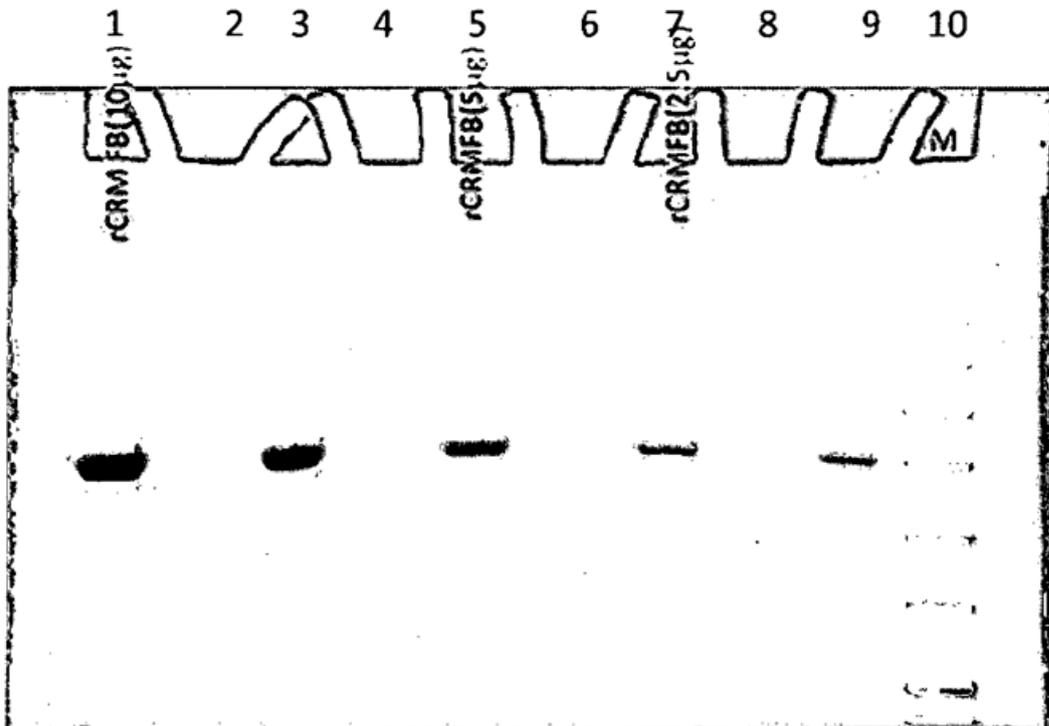


FIGURA 4

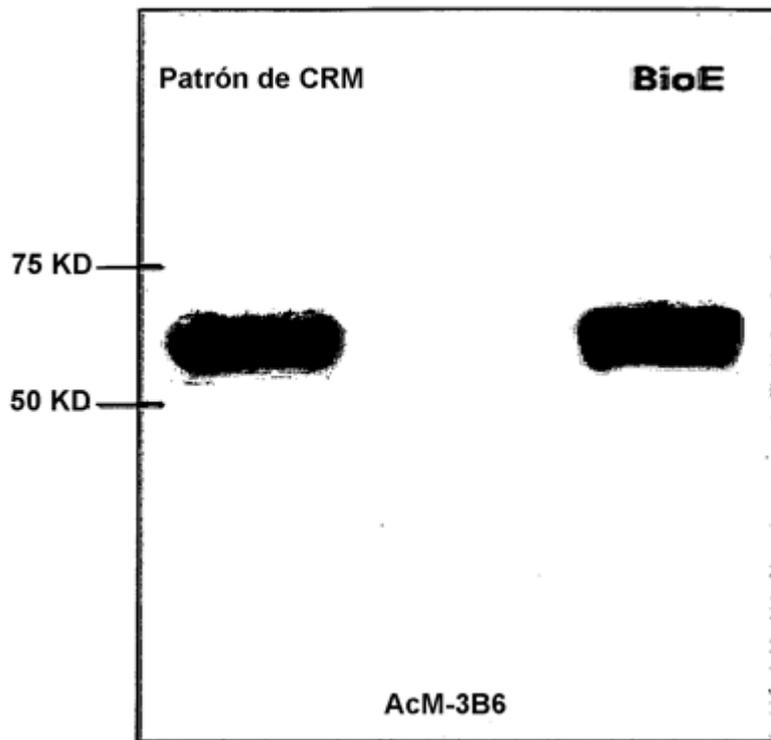


FIGURA 5

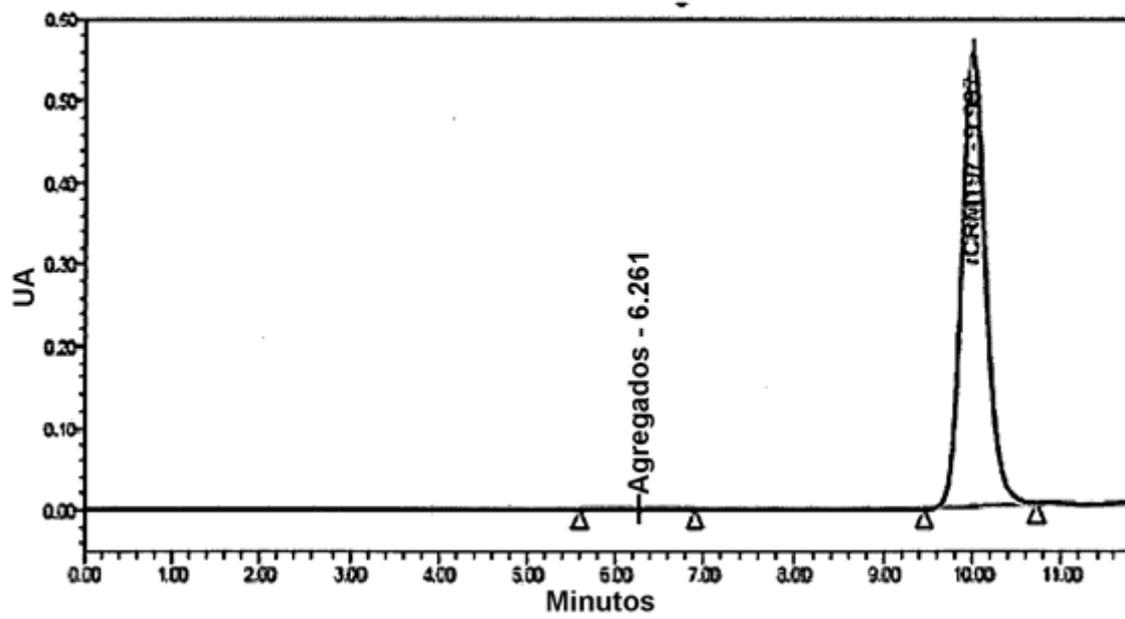


FIGURA 6

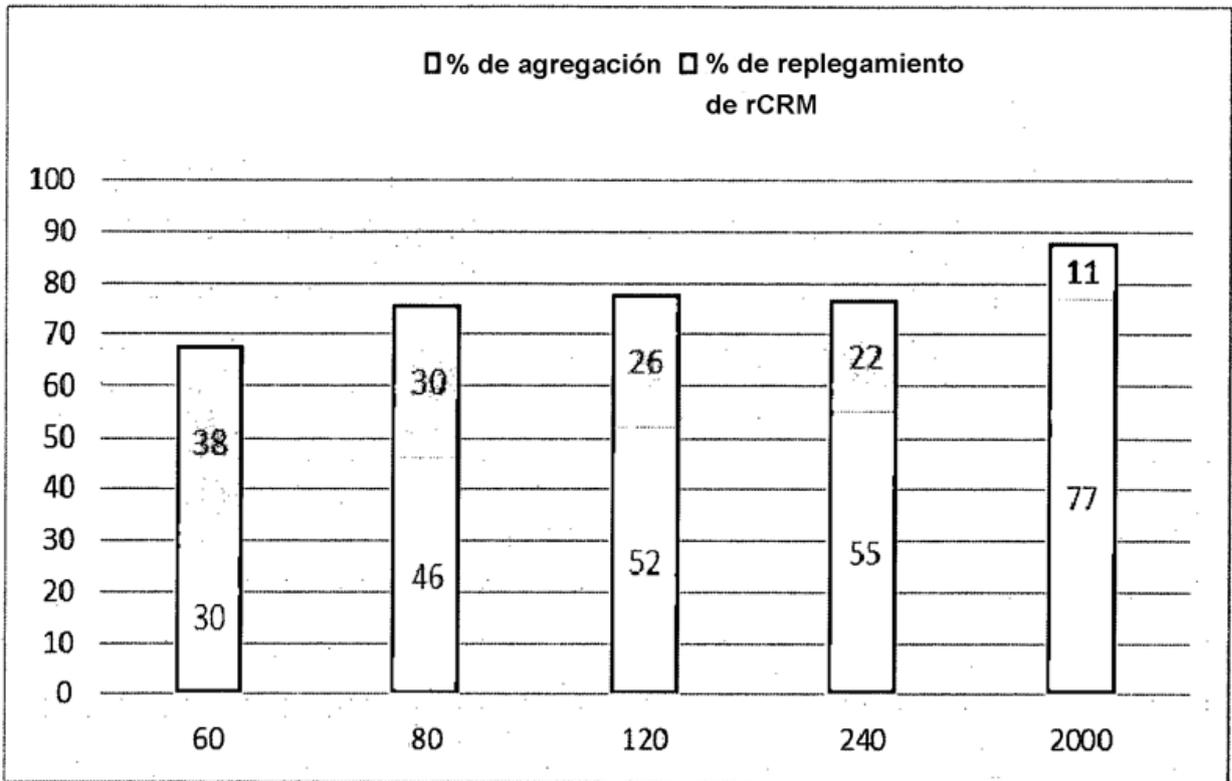


FIGURA 7