



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 184 567**

② Número de solicitud: 200001935

⑤ Int. Cl.⁷: C07K 1/113

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **31.07.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2003**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.04.2003**

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA.**
08193 Bellaterra, Barcelona, ES

⑧ Inventor/es: **Carrio, María del Mar y Villaverde, Antonio**

⑩ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

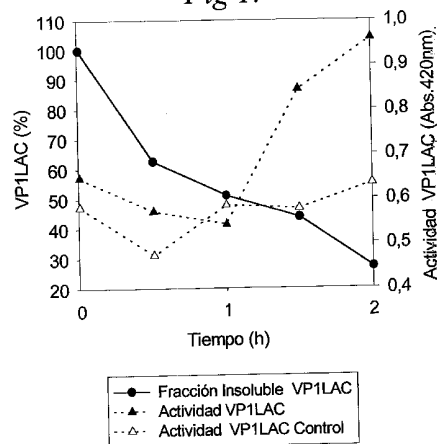
⑤ Título: **Procedimiento para la solubilización de proteínas.**

⑥ Resumen:

Procedimiento para la solubilización de proteínas. El procedimiento de la presente invención tiene por objeto la purificación de proteínas solubles y biológicamente activas, y consiste esencialmente en la incubación de cuerpos de inclusión que contienen la proteína de interés con un extracto celular purificado.

El procedimiento para la solubilización de proteínas de la presente invención comprende las etapas de: a) cultivo de células huésped que expresan la proteína de interés en forma de cuerpos de inclusión; b) lisado de dichas células huésped y extracción y purificación de los cuerpos de inclusión; y se caracteriza por el hecho de que comprende además: c) obtención de un extracto celular purificado; d) tratamiento de los cuerpos de inclusión con dicho extracto celular purificado a una temperatura adecuada; y e) aislamiento y purificación de la proteína solubilizada.

Fig 1.



ES 2 184 567 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para la solubilización de proteínas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de solubilización de proteínas. Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento de solubilización de proteínas recombinantes que forman cuerpos de inclusión.

Antecedentes de la invención

Gran parte de las proteínas de interés biomédico y farmacológico, como hormonas, enzimas, factores de crecimiento o antígenos, se obtienen a partir de sus fuentes naturales en cantidades muy pequeñas, lo que encarece su producción y hace que su comercialización sea, en muchos casos, inviable. El descubrimiento de los enzimas de restricción y la implementación de protocolos para su uso, a finales de la década de los 70, condujo al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante. Esta tecnología permite la clonación de genes codificantes de proteínas de interés y su posterior expresión en células huésped. Si dichos genes se introducen en la célula huésped reemplazando su promotor natural por un promotor regulable, es posible su expresión controlada y, por lo tanto, se pueden producir grandes cantidades de proteínas de importante interés terapéutico e industrial a niveles económicamente rentables. Sin embargo, la obtención de dichas proteínas recombinantes se enfrenta a una serie de dificultades que limitan el rendimiento final y hacen que algunos procesos de producción sean menos eficaces de lo esperado teóricamente. Uno de los principales obstáculos de estos procesos es que la expresión de niveles elevados de proteína recombinante por parte de la célula huésped da lugar a la formación de agregados moleculares insolubles de proteína, conocidos como cuerpos de inclusión [Marston, F. A. O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240, 1-12 (1986)].

Dichos cuerpos de inclusión son estructuras refringentes formadas por proteína mal plegada, insoluble y no funcional. La formación de estos cuerpos de inclusión es un factor no deseado ya que hace disminuir el rendimiento en los procesos de producción de proteína recombinante.

A pesar de que se han descrito distintos métodos para minimizar la formación de cuerpos de inclusión y así mejorar los rendimientos en la producción de proteína soluble y activa, los resultados de la aplicación de dichos protocolos para una proteína en particular son impredecibles y, en general, poco satisfactorios [Strandberg, L. & Enfors, S.O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ. Microbiol.* 57, 1669-1174 (1991); y US-5866362 of Lawrence S. Cousens and Patricia Teckamp-Olson.].

En consecuencia, la mayor parte de esfuerzos se han dedicado al desarrollo de protocolos que permitan solubilizar proteína a partir de los cuerpos de inclusión. Estos protocolos se basan en la purificación de dichos cuerpos de inclusión después de un proceso de producción y la aplicación de agentes desnaturizantes que per-

mitan el desplegamiento proteico completo y la consecuente desintegración de los cuerpos *in vitro* [Clark, E.D.B. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 157-163 (1998) y US-5912327 of Yuling Li et al.].

No obstante, estos agentes deben ser posteriormente eliminados cuidadosamente y en condiciones adecuadas para que las proteínas adopten su conformación natural. Mediante estos protocolos se consigue la recuperación, económicamente costosa, de una pequeña fracción de la proteína contenida en los cuerpos de inclusión, con rendimientos que en los mejores casos no superan el 20%.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de purificación de proteínas que permite obtener proteínas recombinantes solubilizadas y en su conformación biológicamente activa con elevados rendimientos.

Descripción de la invención

El procedimiento de la presente invención tiene por objeto la purificación de proteínas solubles y biológicamente activas, y consiste esencialmente en la incubación de cuerpos de inclusión que contienen la proteína de interés con un extracto celular purificado.

El procedimiento de la invención es aplicable a cualquier tipo de proteínas que puedan formar agregados insolubles durante su producción o manipulación.

Es un objetivo de la presente invención la utilización de un extracto celular purificado, o de algunos de sus componentes, que permitan la solubilización de proteínas agregadas en cuerpos de inclusión y su correcto plegamiento en la forma nativa biológicamente activa.

El procedimiento para la solubilización de proteínas de la presente invención comprende las etapas de:

- a) cultivo de células huésped que expresan la proteína de interés en forma de cuerpos de inclusión;
- b) lisado de dichas células huésped y extracción y purificación de los cuerpos de inclusión; y se caracteriza por el hecho de que comprende además
- c) obtención de un extracto celular purificado;
- d) tratamiento de los cuerpos de inclusión con dicho extracto celular purificado a una temperatura adecuada, preferiblemente comprendida entre 20°C y 50°C; y
- e) aislamiento y purificación de la proteína solubilizada.

Sorprendente e inesperadamente, el tratamiento de dichos cuerpos de inclusión con dicho extracto celular purificado produce la solubilización de la proteína agregada en dichos cuerpos de inclusión y su correcto plegamiento en su forma nativa.

Con el procedimiento de la presente invención se obtienen proteínas con elevados rendimientos y en su forma nativa biológicamente activa.

Por otra parte, este procedimiento se puede aplicar a cualquier tipo de proteína, mientras que otros métodos son específicos para cada proteína en particular.

La célula huésped que expresa la proteína recombinante puede ser una bacteria. Más concre-

tamente, una bacteria de la especie *Escherichia coli*. Dicha célula huésped también puede ser una levadura, más concretamente del género *Saccharomyces*. Asimismo, la célula huésped puede ser una célula animal, una célula vegetal, un hongo o cualquier tipo de célula que pueda ser manipulada genéticamente.

La obtención del extracto celular puede realizarse a partir de cualquier protocolo conocido en el estado de la técnica. Preferiblemente, basado en métodos físicos como la sonicación y alta presión.

Por otra parte, la célula de la que se obtiene el extracto celular purificado puede ser una célula procariota o eucariota.

Ventajosamente, pueden añadirse inhibidores de proteasa al extracto celular con el fin de aumentar el rendimiento del procedimiento de la invención.

Sin embargo, existen otros compuestos, tales como ATP u otros nucleótidos, que añadidos al extracto celular pueden también aumentar el rendimiento de solubilización de las proteínas.

Asimismo, queda dentro del objeto de la presente invención modificaciones de valores tales como fuerza iónica, pH y relación extracto celular/cuerpo de inclusión con el fin de obtener mejores rendimientos en el procedimiento de la invención.

Es de destacar que, a diferencia de la técnica anterior, en el procedimiento de la presente invención no se requiere la adición de agentes desnaturalizantes y su posterior eliminación.

Por lo tanto, la proteína obtenida con el procedimiento de la invención es más fácilmente purificable, evitándose al mismo tiempo la presencia de agentes contaminantes. Además, el procedimiento de la presente invención es aplicable para cualquier proteína que forme agregados insolubles durante su producción o manipulación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la solubilización *in vitro* de cuerpos de inclusión de la proteína VP1LAC.

La figura 2 muestra la solubilización *in vitro* de cuerpos de inclusión de la proteína TSP.

Descripción detallada de las figuras

En la figura 1 se muestra la evolución de la cantidad de proteína VP1LAC presente en cuerpos de inclusión purificados a partir de bacterias productoras de dicha proteína, durante su incubación con extractos celulares concentrados y en presencia de inhibidores de proteasas (círculos negros).

En la figura 1 puede observarse que aproximadamente después de dos horas se ha solubilizado alrededor del 70-80% de toda la proteína agregada. Se muestra además el aumento de la actividad enzimática en paralelo a la solubilización de proteína, lo que prueba que la proteína que se solubiliza a partir de los cuerpos de inclusión alcanza su conformación activa (triángulos negros).

Como control, se muestra que en cuerpos de inclusión de la proteína VP1LAC incubados con tampón (sin extractos celulares), no se produce un aumento de la actividad enzimática (triángulos blancos).

En la figura 2 se muestra la evolución de la cantidad de proteína TSP presente en cuerpos de

inclusión purificados a partir de bacterias productoras de dicha proteína, durante su incubación con extractos celulares concentrados y en presencia de inhibidores de proteasas (círculos negros).

En la figura 2 puede observarse que aproximadamente después de las tres horas se ha solubilizado alrededor del 20-30% de toda la proteína agregada. Se muestra además el aumento de la actividad enzimática en paralelo a la solubilización de proteína, lo que prueba que la proteína que se solubiliza a partir de los cuerpos de inclusión alcanza su conformación activa (triángulos negros).

Como control, se muestra que en cuerpos de inclusión de la proteína TSP incubados con tampón (sin extractos celulares), no se produce un aumento de la actividad enzimática (triángulos blancos).

Ejemplos

A continuación se describen algunos ejemplos representativos, pero no limitativos del objeto de la presente invención.

Ejemplo 1

Obtención de VP1LAC

Para la obtención de VP1LAC se utilizó la cepa de *E. coli* BL21. El plásmido pJVP1LAC es un derivado del pJLA602 que codifica una β -galactosidasa fusionada con la proteína VP1 de la cápside del virus de la fiebre aftosa (FMDV). Su expresión está controlada por los promotores líticos del bacteriófago lambda p_R y p_L y el represor termosensible CI857. La producción de VP1LAC en el citoplasma de *E. coli* da lugar a la formación de cuerpos de inclusión.

Las bacterias recombinantes fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. La inducción de la expresión génica y producción de cuerpos de inclusión se consiguió mediante un aumento de la temperatura, de 28°C a 42°C. Después de 3 horas de inducción, se recuperó el cultivo para la posterior purificación de cuerpos de inclusión.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión, las células se lisaron y fraccionaron mediante el procedimiento estándar de lisozima-NP40. En el último paso, los cuerpos de inclusión purificados fueron lavados dos veces con Tritón X-100 y guardados a -80°C.

Se obtuvo un extracto celular de una cepa de *E. coli* BL26 incubada a 42°C durante 3 horas. El cultivo recuperado se concentró 20 veces con tampón Z, se añadieron los inhibidores de proteasas PMSF (1mM) y benzamidina (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y se sonicó durante 10 minutos a 50W. El cultivo sonicado se centrifugó para recuperar la fracción soluble del extracto.

Se incubaron a 37°C los cuerpos de inclusión de VP1LAC (1,5 $\mu\text{g/ml}$) con 2 ml del extracto celular purificado. Para el control negativo se incubaron los cuerpos de inclusión con el mismo volumen de tampón Z. Se tomaron muestras consecutivas, cada 30 minutos, para el análisis de las fracciones soluble e insoluble y para el test de actividad de la proteína.

Las fracciones soluble e insoluble fueron analizadas mediante geles de poliacrilamida y la proteína fue detectada por Western - Blot usando suero anti - β - galactosidasa. La actividad β -

galactosidasa fue determinada de acuerdo con el método de Miller. Se obtuvo un rendimiento de recuperación de proteína insoluble del 70 %.

Ejemplo 2

Obtención de TSP

Para la obtención de TSP se utilizó la cepa de *E. coli* LacZ⁻ BL26. El plásmido pTTSPA es un derivado de pTrc99 que codifica la proteína TSPA, una TSP pseudo salvaje que conserva todas las actividades biológicas de la TSP. La producción de esta proteína está bajo el control del promotor p_{tac}. La producción de TSP en el citoplasma de *E. coli* da lugar a la formación de cuerpos de inclusión.

Para el cultivo de las bacterias recombinantes se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina. La inducción de la expresión génica y producción de cuerpos de inclusión se consiguió mediante la adición de IPTG (1 mM) y una subida de la temperatura a 42°C. Después de 3 horas de inducción, se recuperó el cultivo para la posterior purificación de cuerpos de inclusión.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión, las células se lisaron y fraccionaron mediante el procedimiento estándar de lisozima-NP40. En el último paso, los cuerpos de inclusión

purificados fueron lavados dos veces con Tritón X-100 y guardados a -80°C.

Se obtuvo un extracto celular de una cepa de *E. coli* BL26 sometida a un heat-shock, a 42°C durante 3 horas. El cultivo recuperado se concentró 20 veces con tampón TMBS, se añadieron los inhibidores de proteasas PMSF (1mM) y benzamida (2,5 µg/ml) y se sonicó durante 10 minutos a 50W. El cultivo sonicado se centrifugó para recuperar la fracción soluble del extracto.

Se incubaron a 37°C los cuerpos de inclusión de TSP (1,5 µg/ml) con 2 ml del extracto celular purificado. Para el control negativo se incubaron los cuerpos de inclusión con el mismo volumen de tampón TMBS. Se tomaron muestras consecutivas, cada 30 minutos, para el análisis de las fracciones soluble e insoluble y para el test de actividad de la proteína.

Las fracciones soluble e insoluble fueron analizadas mediante geles de poliacrilamida y la proteína fue detectada por Western-Blot usando suero anti-P22. La actividad TSP se determinó a través de los bacteriófagos rescatados en un confluente de *Salmonella thypimurium* del ensayo de reasociación de TSP con cabezas del bacteriófago P22. Se obtuvo un rendimiento de solubilización de proteína del 35 %.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la solubilización de proteínas que comprende las etapas de:

a) cultivo de células huésped que expresan la proteína de interés en forma de cuerpos de inclusión;

b) lisado de dichas células huésped y extracción y purificación de los cuerpos de inclusión, **caracterizado** por el hecho de que comprende además

c) obtención de un extracto celular purificado;

d) tratamiento de los cuerpos de inclusión con el extracto celular purificado a una temperatura adecuada; y

e) aislamiento y purificación de la proteína solubilizada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha célula huésped es una bacteria.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha bacteria es *Escherichia coli*.

4. Procedimiento según la reivindicación 1,

donde dicha célula huésped es una levadura.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde dicha levadura es del género *Saccharomyces*.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha célula huésped es una célula animal.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha célula huésped es un hongo.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la célula huésped es una célula vegetal.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho extracto celular purificado puede obtenerse de células procariotas.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho extracto celular purificado puede obtenerse de células eucariotas.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha temperatura está comprendida entre 20°C y 50°C.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que se añaden inhibidores de proteasa al extracto celular.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig 1.

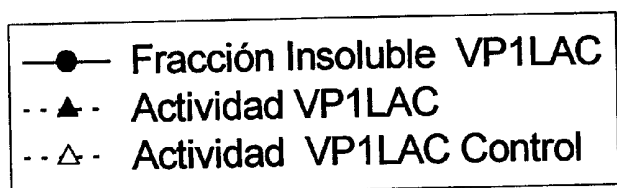
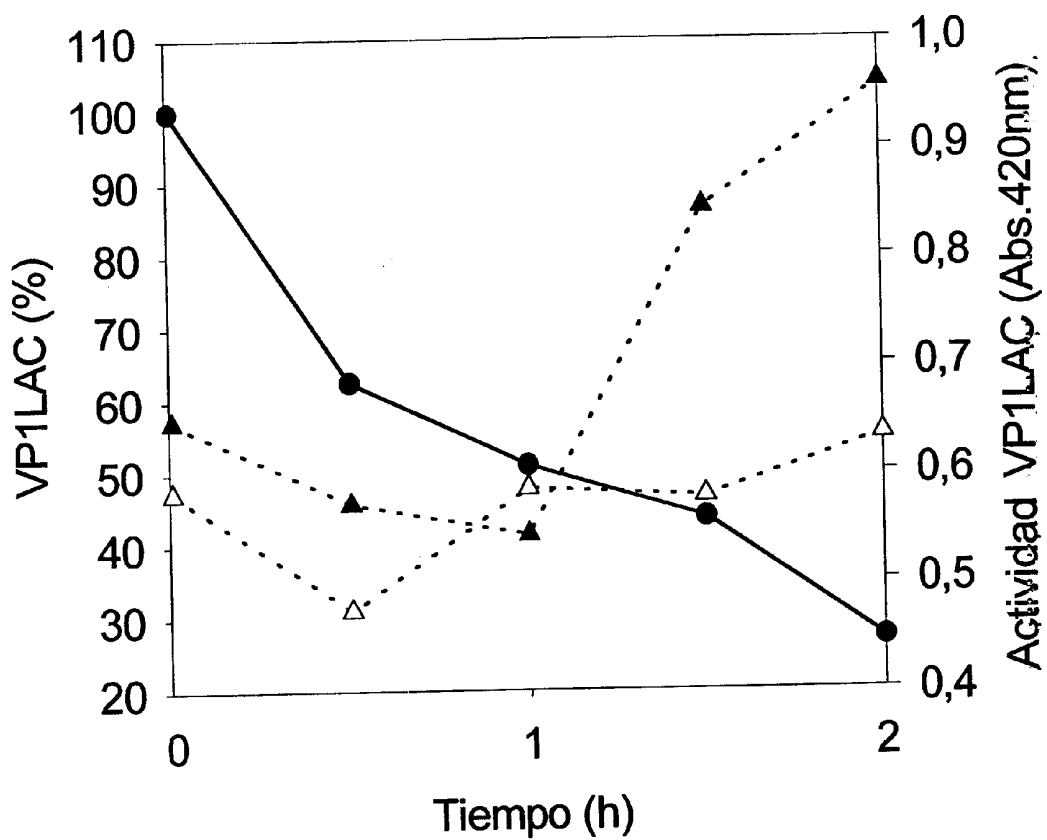
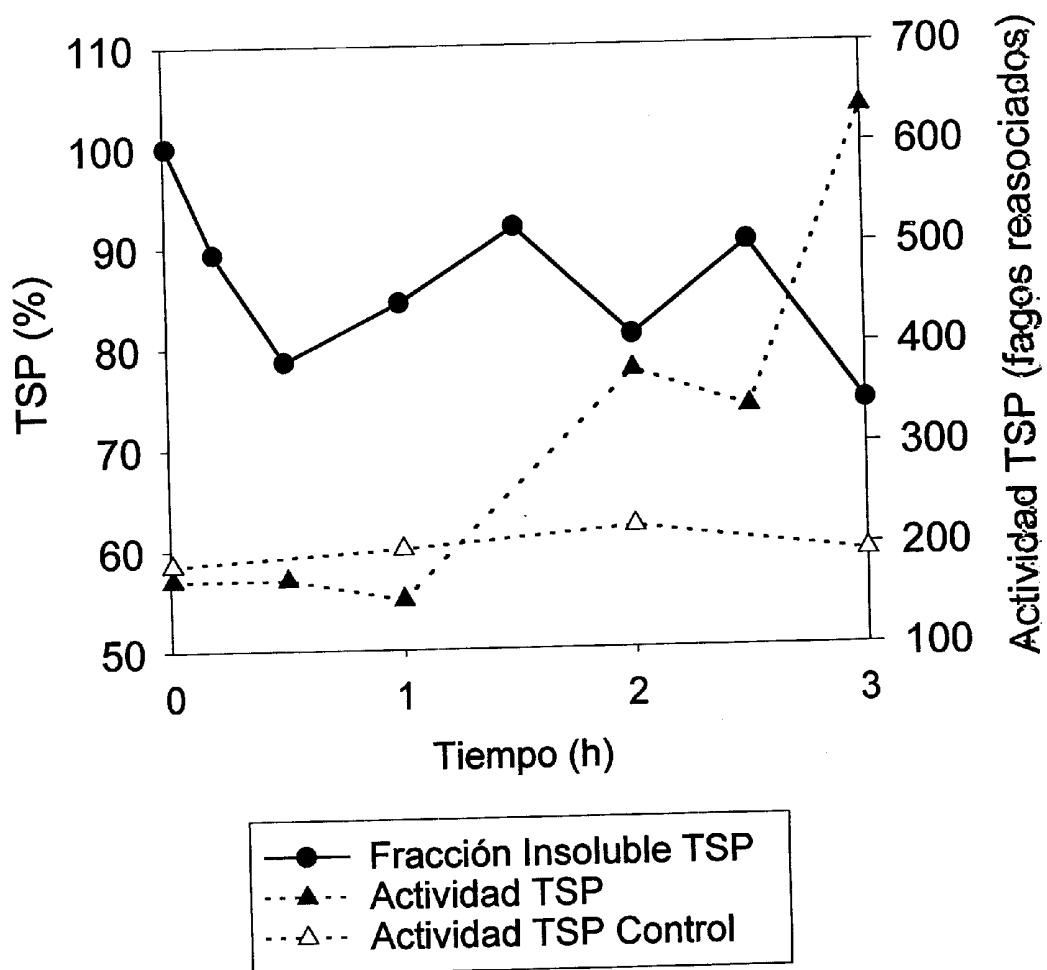


Fig 2.





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 184 567

⑫ N.º solicitud: 200001935

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **31.07.2000**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C07K 1/113

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 743365 A (AJINOMOTO CO., INC.) 20.11.1996, todo el documento.	1-12
A	WO 9325681 A (NEW YORK UNIVERSITY) 23.12.1993, todo el documento.	1-12
A	CARRIÓN, M.M. et al. "Proteolytic digestion of bacterial inclusion body proteins during dynamic transition between soluble and insoluble forms". BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. Vol. 1434, n° 1, 1999, páginas 170-1976, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

30.01.2003

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1