

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 208 001**

21 Número de solicitud: 200100505

51 Int. Cl.⁷: **C12N 15/81**

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.03.2001**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2004**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.06.2004

71 Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Ariño Carmona, Joaquín**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un polipéptido en levaduras.**

57 Resumen:

Procedimiento para la producción de un polipéptido en levaduras.

Consta de cuatro etapas; una primera etapa de fermentación de una célula de levadura que contiene una secuencia de ADN codificante de un polipéptido de interés y que se transcribe bajo control de un promotor de pH, bajo unas condiciones de pH que permiten el crecimiento celular; una segunda etapa en que se incrementa el valor del pH para aumentar la transcripción del polipéptido; una tercera etapa de fermentación durante un determinado periodo de tiempo y en las mismas condiciones de pH que la etapa anterior y una cuarta etapa donde se aísla el polipéptido producido.

El polipéptido aislado es un polipéptido apropiado para la preparación de un producto médico.

ES 2 208 001 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de un polipéptido en levaduras.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido en una célula huésped, y el uso de un promotor regulable por pH.

10 **Antecedentes de la invención**

La tecnología del ADN recombinante ha proporcionado los medios para producir cantidades relativamente elevadas de proteínas y polipéptidos esencialmente puros, de forma eficiente y económica.

15 Usando esta tecnología, las secuencias de ADN que codifican proteínas o polipéptidos podrían incorporarse en células huésped microbianas de tal forma que permitieran a los microbios expresar el material genético y, por tanto, producir las moléculas proteicas deseadas.

20 Además de la capacidad de producir las proteínas y polipéptidos deseados, la tecnología recombinante permite el control de la expresión del gen cuando dicho control es deseable o ventajoso.

25 En una escala industrial, a menudo es deseable controlar la expresión del material de ADN recombinante para permitir el crecimiento máximo, la reproducción y/o la supervivencia de huéspedes en los sistemas de fermentación o, simplemente, para sincronizar la producción de proteína con necesidades específicas o planes de purificación.

Una forma de controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos es por regulación del inicio de la transcripción a través del uso de un sistema promotor/operador bien caracterizado.

30 La patente WO-92/08797 describe un promotor regulable por pH aislado a partir de *E. coli* (p. 2. líneas 26-28) y afirma que este promotor podría usarse en una bacteria (p. 7, líneas 7-15).

La patente de EE.UU. n° 5.830.692 describe un sistema de expresión regulable por pH apropiado para su uso en bacterias gramm-positivas o gramm-negativas (ver página 5).

35 Espeso *et al.* (J. Biol. Chem. 271:46, 28825-28830 (1996)) describen un promotor regulable por pH procedente de *Aspergillus nidulans*.

40 Hill K.F. *et al.* (Arch. Microbiol. 153:4 355-359 (1990)) describe que un promotor menCD de *Bacillus subtilis* responde al pH extracelular.

45 Es conocido el uso de sistemas promotores en levaduras basados en la regulación por temperatura, y sistemas que usan diferentes moléculas inductoras/represoras específicas para la regulación. Estos últimos incluyen sistemas tales como el *GALI-GAL10*, que está reprimido mientras las levaduras crecen en un medio que incluye glucosa y es activado/inducido por galactosa; o sistemas que se basan en el promotor *CUPI*, activado/inducido por cobre.

Descripción de la invención

50 La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la producción recombinante de un polipéptido de interés en una célula de levadura basándose en la identificación de varios promotores que son regulables por pH en una célula de levadura. Los promotores identificados comprenden las secuencias mostradas como SEQ. ID. n° 1, 2 y 3.

55 Basándose en la información de secuencias promotoras aquí descubierta, en combinación con la descripción detallada de estrategias apropiadas para obtener otras secuencias promotoras apropiadas regulables por pH (ver más abajo), está incluido en el ámbito del conocimiento general de las personas especializadas, el identificar tales secuencias promotoras apropiadas regulables por pH.

60 Tal secuencia promotora, regulable por pH en levaduras, proporciona la posibilidad de producir un polipéptido recombinante de interés en levaduras, utilizando dicha característica como un elemento esencial en el procedimiento de producción.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un polipéptido de interés, que comprende las siguientes etapas:

65 (a) fermentar una célula de levadura, la cual comprende una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, y que se transcribe bajo el control de un promotor regulable por pH, en un medio apropiado, durante un periodo de tiempo apropiado, en condiciones de pH que permiten el crecimiento de la célula de levadura;

(b) cambiar el valor de *pH* del medio de fermentación de la etapa (a) a un valor de *pH* en el que el promotor regulable por *pH* está transcribiendo la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés a un nivel que es al menos 2 veces superior al de las condiciones de *pH* de (a);

5 (c) fermentar al valor de *pH* de la etapa (b) durante un período de tiempo apropiado; y

(d) aislar el polipéptido de interés producido.

10 Una característica ventajosa del procedimiento de producción en levaduras descrito es que una regulación de la actividad del promotor basada en un cambio de *pH* del medio de fermentación es relativamente fácil y barata comparada con el uso de sistemas promotores basados en la regulación de la temperatura o en sistemas regulables basados en moléculas inductoras/activadoras. En éste último, las moléculas inductoras/activadoras específicas podrían ser bastante caras. Más aún, podrían ser indeseables desde el punto de vista de, por ejemplo, consideraciones medioambientales.

15 Esto es particularmente cierto para el caso de producción industrial a gran escala de polipéptidos, en donde, por ejemplo, un cambio de temperatura de un tanque de fermentación a gran escala (tal como un tanque de 1000 litros) podría ser bastante caro y lento.

Definiciones

20

A continuación se aportan una serie de definiciones de términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

25 El término "bajo condiciones de *pH* que permiten el crecimiento de la célula de levadura" de la etapa (a) correspondiente al procedimiento de obtención del polipéptido denota aquí un crecimiento de la célula de levadura que es suficientemente efectivo para una producción industrial relevante. Preferiblemente, éste es de al menos una velocidad de duplicación de las células de levadura de 1 duplicación de células de levaduras cada 90 minutos.

30 El término "el promotor regulable por *pH* está transcribiendo la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés a un nivel que es al menos 2 veces superior al de las condiciones de *pH* de (a)" de la etapa (b) del procedimiento de obtención del polipéptido es un término relativo. El nivel de transcripción en las condiciones de *pH* de la etapa (a) y de la etapa (b) está determinada, y la velocidad de transcripción relativa incrementada de la etapa (b) está determinada. Preferiblemente, el nivel de transcripción en cada etapa se mide al nivel del mRNA mediante determinación de la cantidad de mRNA, dentro de la célula de levadura, para el polipéptido de interés bajo las condiciones de cada etapa (a) y (b). Preferiblemente, las determinaciones deberían realizarse en ambos casos en el determinado momento en que la cantidad de mRNA para el polipéptido de interés, dentro de la célula, sea relativamente estable a lo largo del tiempo. El procedimiento específico para hacer esto es bien conocido por una persona especializada, e incluye el ensayo de transferencia Northern, procedimientos de PCR cuantitativa, etc.

40 En relación con la etapa (b) debería entenderse que el cambio de *pH* de la etapa (b) podría causar la detención del crecimiento celular, o una velocidad de crecimiento significativamente reducida con respecto a la etapa (a). Esto podría ser en realidad una ventaja. Por ejemplo, si el valor de *pH* de la etapa (a) se mantiene hasta cerca de la máxima masa celular permisible en un tanque de fermentación, entonces el cambio de *pH* durante la etapa (b) podría iniciar la producción del polipéptido de interés sin que las células de levadura tuvieran que usar recursos del medio para crecer.

45 El término "período de tiempo apropiado" en relación al período de tiempo de fermentación debería entenderse aquí según el conocimiento general de las personas especializadas. La persona especializada conoce qué es un "período de tiempo apropiado" según su protocolo de fermentación específico. En la etapa (a) este podría variar preferiblemente desde 5 horas hasta 10 días, más preferiblemente desde 1 día hasta 5 días, y en la etapa (c) normalmente será un período de tiempo más corto, preferiblemente desde 5 minutos hasta 1 día, más preferiblemente desde 10 minutos hasta 3 horas.

50 El término "medio apropiado" denota cualquiera de los numerosos medios apropiados para el crecimiento (fermentación) de una célula de levadura, los cuales son conocidos por las personas especializadas. Se hace referencia a (Sambrook *et al.* (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R. y Cutting, S.M. (eds.); Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I. (eds.), "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology 194: 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.* Journal of Bacteriology 153: 163 (1983); y Hinner *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920 (1978)) para ulteriores descripciones de ejemplos de tales medios apropiados.

60

65 El término "aislar el polipéptido de interés producido" de la etapa (b) denota que el polipéptido de interés se aísla a partir del medio de fermentación según los procedimientos de aislamiento estándares conocidos por los especialistas. El polipéptido de interés producido se puede secretar hacia el medio de cultivo (por ejemplo, como un producto de fusión, que, por ejemplo, pueda ser separado) o se puede producir como un polipéptido no secretado. El polipéptido de interés se puede recuperar/aislar mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, la precipitación de componentes proteicos del medio mediante una sal tal como el sulfato amónico, seguida por procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, o similares.

ES 2 208 001 A1

Después del aislamiento, el polipéptido de interés es preferiblemente al menos aproximadamente un 20% puro, más preferiblemente aproximadamente un 50% puro, incluso más preferiblemente aproximadamente un 70% puro, más preferiblemente aproximadamente un 90% puro, e incluso aún más preferiblemente aproximadamente un 95% puro, tal como se determina mediante SDS-PAGE.

Las realizaciones de la presente invención se describen posteriormente, a modo de ilustración pero no como limitación.

Etapas del procedimiento para la producción de polipéptidos

Aparte de las etapas individuales (a), (b), (c) y (d) descritas anteriormente, el procedimiento para producir un polipéptido según se describe aquí podría comprender otras etapas.

Una etapa extra podría ser reajustar el valor de pH después de la etapa (c) al nivel original de la etapa (a) antes del aislamiento efectivo del polipéptido de interés (etapa (d)).

Promotores apropiados, los cuales son regulables por pH en una célula

En la SEQ. ID. n° 1, 2 y 3 se muestran secuencias de ADN de promotores preferidos que son regulables por pH en levaduras. El promotor se obtiene a partir de la célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y la secuencia podría clonarse a partir de tal célula basándose en la información de la secuencia proporcionada en SEQ. ID. n° 1, 2 y/o 3, y usando protocolos de clonación estándar conocidos. En un ejemplo de realización de la invención (ver más abajo) se describen aún más las características de regulación por pH del promotor de la SEQ. 1.

En la fecha de registro de la presente solicitud, la secuencia mostrada en SEQ. ID. n° 1 estaba en la base de datos disponible públicamente "SGD Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)" identificada como "CHR4 Chromosome IV Sequence", teniendo coordenadas entre los pares de bases 538.561 y 539.161, y en referencia a las anotaciones se afirmaba "Esta región del cromosoma IV que abarca las coordenadas 538.561 a 539.161 NO tiene anotaciones".

En la fecha de registro de la presente aplicación, la secuencia mostrada en SEQ. ID. n° 2 estaba en la base de datos disponible públicamente "SGD Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)" identificada como "CHR13 Chromosome XIII Sequence", teniendo coordenadas entre los pares de bases 25.901-26.501, y en referencia a las anotaciones se afirmaba "YML122C (ORF hipotético). YML122C no tiene homologías significativas con ninguna proteína de levaduras o gusanos, y por tanto no aparece en ninguna agrupación (*cluster*) compartida o no compartida".

En la fecha de registro de la presente aplicación, la secuencia mostrada en SEQ. ID. n° 3 estaba en la base de datos disponible públicamente "SGD Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)" identificada como "CHR2 Chromosome II Sequence", teniendo coordenadas entre los pares de bases 25.901-26.501, y en referencia a las anotaciones se afirmaba "Esta región del cromosoma 2 que abarca las coordenadas 798.578 a 799.178 no tiene anotaciones".

Una forma sencilla de identificar otras secuencias distintas de las secuencias promotoras apropiadas mostradas en SEQ. ID. n° 1, 2 y 3, es usar una sonda de ADN basada en las secuencias mostradas como SEQ. ID. n° 1, 2 y 3. Esta sonda de ADN se podría utilizar, a continuación, para verificar bibliotecas de ADN procedentes de una célula de levadura con objeto de identificar promotores homólogos en células de levadura.

Por consiguiente, la realización de la invención se refiere a un procedimiento del primer aspecto de la invención, en el que el promotor regulable por pH comprende una secuencia de ADN seleccionada a partir del grupo formado por,

(i) la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 1-501 de la SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de la SEQ. ID. n° 2 ó 3;

(ii) una secuencia de ADN que es al menos idéntica en un 60% a una de las secuencia de ADN de (i)

(iii) una secuencia de ADN que hibrida con una sonda de ADN de cadena doble que comprende una de las secuencias mostrada en las posiciones 1-501 de la SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de la SEQ. ID. n° 2 ó 3; en condiciones de baja severidad;

(iv) una secuencia de ADN que es un fragmento de las secuencias de ADN especificadas en (i), (ii) o (iii).

La identidad de la secuencia de ADN en la referencia anterior (punto (ii)) se determina como el grado de identidad entre dos secuencias, indicando una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La identidad podría determinarse de forma apropiada mediante un programa de ordenador conocido en la técnica, tal como el GAP proporcionado en el paquete de programas GCG ("Program Manual for the Wisconsin Package", Versión 8, Agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., Journal of Molecular Biology 48: 443-453 (1970)). Usando GAP con los siguientes parámetros para

la comparación de secuencias de ADN: penalización de la creación en GAP de 5,0, y penalización de la extensión en GAP de 0,3, una secuencia de ADN parcialmente idéntica a la secuencia mostrada en SEQ. ID. n° 1, 2 ó 3 (ver apartado (ii) anterior) exhibe un grado de identidad preferiblemente de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 95%, más preferiblemente de al menos un 97% con la secuencia mostrada en 1-501 en la SEQ. ID. n° 1, ó 1-601 en la SEQ. ID. n° 2 ó 3.

Las condiciones de hibridación, mencionadas más arriba para definir una secuencia de ADN tal como se define en la etapa (iii) anterior, que hibridan una sonda de ADN de doble cadena, que comprende la secuencia mostrada en las posiciones 1-501 en la SEQ. ID. n° 1, ó 1-601 en la SEQ. ID. n° 2 ó 3, en, al menos, condiciones de baja severidad, pero preferiblemente en condiciones de severidad media o elevada, son tal y como se describen con detalle a continuación.

Las condiciones experimentales apropiadas para determinar la hibridación entre una sonda nucleotídica y una secuencia de ADN o ARN homóloga, con baja, media y elevada severidad, implican empapar previamente el filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN a hibridar en 5xSSC (cloruro sódico/citrato sódico, Sambrook *et al.* 1989) durante 10 minutos, y prehibridar el filtro en una solución de 5xSSC, 5x solución de Denhardt (Sambrook *et al.*, 1989), SDS al 0,5% y 100 µg/ml de ADN de esperma "sonicado" de salmón (Sambrook *et al.*, 1989), seguida del proceso de hibridación, en la misma solución, que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda, cebada aleatoriamente (Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. Anal. Biochem. 132: 6-13 (1983)), marcada con ³²P-dCTP (actividad específica > 1 x 10⁹ c.p.m./µg) durante 12 horas a aproximadamente 45°C. A continuación se lava el filtro dos veces durante 30 minutos en 2xSSC, SDS al 0,5% a al menos 55°C (baja severidad), más preferiblemente a al menos 60°C (severidad media), aún más preferiblemente a al menos 65°C (severidad media/elevada), incluso más preferiblemente a al menos 70°C (severidad elevada), e incluso más preferiblemente a al menos 75°C (severidad muy elevada).

Las moléculas a las cuales se hibrida la sonda oligonucleotídica en estas condiciones se detectan usando película para rayos X.

Otra forma de identificar secuencias promotoras apropiadas es utilizando información derivada a partir de secuencias parciales de las SEQ. ID. n° 1, 2 ó 3. La información obtenida a partir de estas secuencias parciales podría utilizarse entonces en la preparación de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que puedan utilizarse para identificar secuencias promotoras apropiadas. Por ejemplo, puede prepararse una reacción de PCR utilizando tales cebadores para PCR, utilizando ADN procedente de una célula de levadura como plantilla (por ejemplo, a modo de biblioteca de ADN de levadura o, por ejemplo usando una célula de levadura nativa (tipo salvaje) a modo de plantilla de muestra). Tales reacciones de PCR son trabajo rutinario para las personas especializadas. El fragmento de PCR resultante podría comprender entonces la información de la secuencia completa para un promotor apropiado, o la información de la secuencia en el fragmento de PCR podría usarse para clonar la secuencia completa del promotor.

Aún otra forma de identificar secuencias de promotores apropiadas es buscando promotores que comprendan motivos de secuencia de ADN derivados de la información en las secuencias parciales de SEQ. ID. n° 1, 2 ó 3.

En vez de identificar promotores apropiados mediante una estrategia basada principalmente en la información de la secuencia derivada a partir de las SEQ. ID. n° 1, 2 ó 3, podría ser preferible identificar tales promotores basándose en estrategias que usan el "cambio del pH" como un parámetro funcional esencial.

Los ejemplos de procedimientos experimentales apropiados discutidos más abajo ("captura del promotor" y tecnología de "chips genómicos") tienen en común un punto esencial. Las bibliotecas de ADN genómico o cADN de una célula de levadura se ensayan en los procedimientos a (1) un valor de pH que se sabe es apropiado para el crecimiento de la célula de levadura específica, y (2) a otro valor de pH distinto de (1). A continuación se identifican las secuencias de promotor específicas, las cuales transcriben un polipéptido a un nivel significativamente más elevado bajo las condiciones de pH en (2), en comparación con las condiciones de pH en (1).

El procedimiento de "captura del promotor" es conocido en la técnica (Ruby, S.W., Szostak, J.W. Murray, A.W. "Cloning regulated yeast genes from a pool of *lacZ* fusions", *Methods in Enzymology* 101: 253-269 (1983); Santangelo, G.M., Tornow, J., Moldave, K. "Cloning of open reading frames and promoters from the *Saccharomyces cerevisiae* genome: construction of genomic libraries of random small fragments", *Gene* 46: 181-186 (1986); Dang V.D., Valens M., Bolotin-Fukuhara M., Daignan-Fornier B. "A genetic screen to isolate genes regulated by the yeast CCAAT-box binding protein Hap2p", *Yeast* 10: 1273-1283 (1994); Bell P.J., Davies I.W., Attfield P.V. "Facilitating functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome using an EGFP-based promoter library and flow cytometry", *Yeast* 15(16): 1747-1759 (1999)).

El procedimiento se basa en la clonación de fragmentos de tamaño moderado del ADN genómico en vectores especializados que contienen un gen revelador cuya transcripción podría detectarse fácilmente. Un ejemplo podría ser el gen *LacZ*, cuya actividad puede detectarse mediante una coloración específica alrededor de colonias específicas de levaduras. Esto podría hacerse directamente o después de transferir a membranas apropiadas. En el presente contexto, se usa preferentemente una biblioteca de diferentes promotores unidos al gen revelador. Dicha biblioteca podría ensayarse en las condiciones de pH (1) y (2) anteriores, y los clones que expresaran el gen revelador (por ejemplo, *LacZ*) con niveles significativamente superiores en las condiciones de pH (2) en comparación con las condiciones de pH (1) generalmente incluirían un promotor apropiado en el presente contexto.

La tecnología del "chip genómico" también es conocida en la técnica (DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. "Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale" *Science* 278: 680-686 (1997); Wodicka L., Dong H., Mittmann M., Ho M.H., Lockhart D.J. "Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*" *Nat. Biotechnol.* 15: 1359-1367 (1997); Jelinsky S.A. y Samson L.D. "Global Response of *Saccharomyces cerevisiae* to an Alkylating Agent" *PNAS* 96: 1486-1491 (1999); Stewart, D.J. "Making and Using DNA Microarrays: A Short Course at Cold Spring Harbor Laboratory" *Genome Res.* 10: 1-3 (2000)).

El procedimiento se basa en la secuencia completa conocida del genoma de la célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el uso de esta información de la secuencia, se han desarrollado sistemas de hibridación en los que los fragmentos de PCR u oligonucleótidos, específicos para cada gen en la célula *S. cerevisiae*, se han fijado sobre un soporte sólido de forma organizada (matriz genómica). Los soportes sólidos podrían ser "chips" de silicona, placas de vidrio (similares a las usadas en microscopía) o membranas de nilón. Tales sistemas de hibridación están disponibles comercialmente (por ejemplo, Affymetrix Inc. (Santa Clara, CA, EE.UU.), Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.).

En el contexto presente es preferible obtener mRNA total a partir de una célula de levadura (preferiblemente una célula *Saccharomyces cerevisiae*) cultivada en las dos condiciones de pH (1) y (2) mencionadas anteriormente. A partir de las dos poblaciones de mRNA total se prepara cADN, el cual está marcado radiactivamente o mediante fluorescencia. A continuación, se hibridan estas poblaciones/bibliotecas de cADN con el sistema matriz tal como se ha descrito anteriormente. En el caso de marcaje fluorescente distinto es preferible mezclar cantidades iguales de las dos bibliotecas de cADN, con lo que se producirá una hibridación competitiva. El resultado de tal protocolo será la identificación de mRNA producido con un nivel significativamente superior en la condición de pH (2) en comparación con la condición de pH (1). Este mRNA probablemente se transcribirá mediante un promotor regulable por pH, apropiado en el presente contexto. En consecuencia, la información en la secuencia de un mRNA identificado de esta forma puede ser utilizado para identificar el promotor que transcribe dicho mRNA, según los protocolos estándar conocidos por las personas especializadas.

En ambos procedimientos anteriores, "captura del promotor" y el "chip genómico", se prefiere que el pH de la etapa (a) sea un valor de pH desde pH 4 hasta pH 7, y el pH se incrementa en la etapa (b) hasta un valor de pH desde 6,5 hasta 9,5.

Esto se debe principalmente al hecho de que un cierto número de cepas de levaduras, conocidas por ser muy apropiadas para la producción a gran escala del polipéptido de interés, tienen una velocidad de crecimiento óptima a pH con valores ligeramente ácidos. Tales cepas de levaduras incluyen una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y, quizás, una cepa de *Pichia pastoris*.

Valores de pH preferidos de la etapa (a) y etapa (b), (c) del primer aspecto de la invención.

Tal como se ha mencionado anteriormente, un cierto número de cepas de levaduras, conocidas por ser muy apropiadas para la producción a gran escala de un polipéptido de interés, tienen una velocidad de crecimiento óptima a valores de pH ligeramente ácidos.

En consecuencia, se prefiere fermentar la célula de levadura en la etapa (a) del procedimiento de la invención en condiciones de pH similares a éstas, con objeto de asegurar el crecimiento suficiente de las células de levadura; mientras que en la etapa (b) se prefiere incrementar ligeramente esta condición de pH. Un ejemplo de esto se muestra en el ejemplo de procedimiento 2, en donde se usa el promotor de la SEQ. ID. n° 1.

Por tanto, una realización de la invención se refiere a un procedimiento en donde las condiciones de pH de la etapa (a) es un valor de pH seleccionado desde pH 4 hasta pH 7 y el pH se incrementa en la etapa (b) hasta un valor de pH desde 6,5 hasta pH 9,5. El término "incrementado", mencionado anteriormente, denota que si el valor de pH de la etapa (a) es, por ejemplo, 7,25 no puede ser, por ejemplo, 6,75 en la etapa (b), puesto que este no es un incremento del valor de pH.

Preferiblemente las condiciones de pH de la etapa (a) comprenden un valor de pH desde pH 5 hasta pH 7, y el pH se incrementa en la etapa (b) desde un valor de pH 7,25 hasta 9,0.

Incremento relativo del nivel de transcripción del promotor regulable por pH

Una realización preferida de un procedimiento, tal como se describe en la presente invención, es aquella en que el nivel de transcripción por el promotor regulable por pH de la etapa (b) es al menos 3 veces más alto que bajo las condiciones de (a), preferiblemente al menos 5 veces más alto que bajo las condiciones de (a), más preferiblemente al menos 10 veces más alto que bajo las condiciones de (a), e incluso aún más preferiblemente al menos 50 veces más alto que bajo las condiciones de (a). Ver el ejemplo de procedimiento 2 como ejemplo de este último caso.

Célula de levadura

Podría utilizarse cualquier célula de levadura en el procedimiento de la invención tal como se describe aquí.

No obstante, preferiblemente es una célula de levadura seleccionada entre el grupo formado por: *Hansenula poli-*

ES 2 208 001 A1

morpha, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis*, y *Saccharomyces cerevisiae*. De la lista anterior; más preferiblemente es una célula de levadura seleccionada de entre el grupo formado por *Pichia pastoris*, *Candida utilis* y aún más preferiblemente una célula *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Tal como se ha mencionado anteriormente, una célula de levadura usada en el procedimiento, tal como se describe en la invención, incluye una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, el cual se transcribe bajo el control de un promotor regulable por pH.

10 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés y el promotor regulable por pH podrían, por ejemplo, estar ubicadas en el cromosoma de la célula de levadura o, por ejemplo, estar ubicadas en un vector (por ejemplo, un plásmido) en el interior de la célula.

Más aún, la célula de levadura podría incluir otros elementos apropiados tales como un gen marcador elegible, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos.

15 *Producción a gran escala*

Tal como se ha mencionado anteriormente, un procedimiento como el aquí descrito, es muy apropiado para la producción a gran escala (ver sección "Resumen de la invención").

20 Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un procedimiento tal como el aquí descrito, en el que la fermentación en las etapas (a), (b) y (c) se realiza en un tanque de fermentación que comprende al menos 100 litros de medio apropiado, preferiblemente en un tanque de fermentación que comprende al menos 500 litros de un medio apropiado, y más preferiblemente en un tanque de fermentación que comprende al menos 10.000 litros de un medio apropiado.

25 Forma parte del conocimiento de las personas especializadas escalar un proceso de fermentación, preferiblemente mediante un escalado paso a paso, en donde cada paso implica la fermentación en tanques de fermentación cada vez mayores.

30 *Polipéptido de interés*

Cualquier polipéptido de interés podría ser producido ventajosamente según el procedimiento de la invención tal como se describe aquí. Preferiblemente, el polipéptido de interés es un polipéptido apropiado para ser utilizado en la preparación de un producto médico, y más preferiblemente el polipéptido es la insulina humana, la hormona de crecimiento humana, la colecistoquinina humana, el interferón, el activador del plasminógeno humano (u-PA), las interleucinas 2 y 3, o diferentes tipos de vacunas de subunidades recombinantes.

35 *Una célula de levadura que comprende un promotor regulable por pH*

40 Un aspecto final de la invención se refiere a una célula de levadura que incluye un promotor regulable por pH operativamente unido a un gen heterólogo, que incluye ADN que codifica un polipéptido de interés, en donde el promotor regulable por pH incluye una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo formado por:

45 (i) la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 1-501 de SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de SEQ. ID. n° 2 ó 3;

(ii) una secuencia de ADN que es al menos un 60% idéntica a una de las secuencias de ADN de (i);

50 (iii) una secuencia de ADN que se hibrida con una sonda de ADN de doble cadena que incluye una de las secuencias mostradas en las posiciones 1-501 de SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de SEQ. ID. n° 2 ó 3; a baja severidad;

(iv) una secuencia de ADN que es un fragmento de las secuencias de ADN especificadas en (i), (ii) o (iii).

55 Todas las realizaciones preferidas anteriores son también realizaciones preferidas de una célula de levadura que presente estas características finales.

60 El término "gen heterólogo" se refiere aquí a un gen bajo la regulación de un promotor que no lo controla de forma natural. Un gen heterólogo puede codificar cualquier péptido, polipéptido o proteína, excepto aquél que es codificado por un gen que presenta un promotor que controla su expresión normalmente en la naturaleza.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

65 *Cepas*

Cepas de levadura: La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada fue la W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+). La cepa de *E. coli* fue: DH10B (Life Technologies).

Plásmidos

pUC18: (Life Technologies), pJS205 (no es comercial, se describe en el documento. Schüller HJ, Hahn A, Tröster F, Schütz A, Schweizer E (1992) "Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes FAS1 and FAS2 by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis" EMBO J 11:107-114).

Procedimientos generales de biología molecular

A menos que se mencione lo contrario, las manipulaciones de ADN y las transformaciones se llevaron a cabo utilizando procedimientos estándar de la biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R. y Cutting, S.M. (eds.) "Molecular Biology Methods for Bacillus", John Wiley and Sons, 1990; Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I. (eds.), "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology 194: 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York).

Los enzimas para las manipulaciones del ADN se usaron según las especificaciones de los proveedores.

Enzimas para las manipulaciones del ADN

A menos que se mencione lo contrario, todos los enzimas para las manipulaciones del ADN, tales como, por ejemplo, endonucleasas de restricción, ligasas, etc. se obtuvieron de New England Biolabs, Inc.

Ejemplo 1

Construcción de un plásmido *pPH1* que incluye el promotor regulable por pH de la secuencia con número de identificación 1, operativamente unido a un gen informador *LacZ*

El plásmido *pPH1* se construyó tal como se describe a continuación. Se amplificó un fragmento de ADN de 0,5 kpb, que incluye la SEQ. ID. n° 1, a partir de ADN genómico mediante PCR usando los oligonucleótidos A1_{fw} y A1_{rev}.

A1_{fw} : 5' - CATGCTCGAGTTTATCTCGTCACTCTTGAC - 3'

A1_{rev} : 5' - CGATCTCGAGTCCCTGTATATATCTATGTA - 3'

Este fragmento se purificó, se digirió con *XhoI*, y se clonó en el plásmido pUC18 previamente digerido con el mismo enzima de restricción. Se secuenció el inserto para verificar mutaciones no deseadas, y a continuación se clonó en el sitio *XhoI* del plásmido pJS205. La orientación apropiada del inserto se evaluó mediante análisis de restricción y/o secuenciación del ADN.

Ejemplo 2

Demostrando que el promotor de la secuencia con número de identificación 1 es regulable por el pH en levaduras

El plásmido *pPH1* del ejemplo 1 se transformó dentro de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, y se recuperó en medio CM que carecía de uracilo.

Se dejó crecer la cepa transformada, a 28°C en medio CM que carecía de uracilo, hasta una OD₆₀₀ de 1,0-2,0. Se añadió una alícuota del cultivo a un medio YPD estándar a pH 6,5 (condición de pH (1)) para conseguir una OD₆₀₀ de 0,2, y se retomó el crecimiento hasta una OD₆₀₀ de 0,5-0,6.

Se tomó una alícuota del cultivo, y se incrementó el valor de pH hasta pH 7,75 (condición de pH (2)) y se continuó la fermentación durante 1 hora, y se midió la cantidad de gen *LacZ* expresado.

Los resultados se muestran, a continuación, en la Tabla I:

TABLA I

Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de tres clones independientes, y se expresan como unidades de actividad de β -galactosidasa según Ausubel, F.M *et al.* (eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995.

Condición (pH)	Actividad β -galactosidasa
pH 6,5	4,0 \pm 0,9
pH 7,75	353 \pm 84

Estos resultados demuestran claramente que el promotor de la SEQ. ID. n° 1 es regulable por pH en células de levadura. Más aún, puede observarse que el nivel de transcripción es más de 50 veces superior bajo la condición de pH (2) (pH = 7,75) comparado con el de la condición de pH (1) (pH = 6,5).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un polipéptido de interés que comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) fermentar una célula de levadura, la cual incluye una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés y se transcribe bajo el control de un promotor regulable por pH, en un medio apropiado, durante un período de tiempo apropiado, y en condiciones de pH que permiten el crecimiento de la célula de levadura;
- 10 (b) cambiar el valor de pH del medio de fermentación de la etapa (a) a un valor de pH en el cual el promotor regulable por pH transcribe la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés a un nivel que es al menos 2 veces superior al de en condiciones de pH de (a);
- (c) fermentar al valor de pH de la etapa (b) durante un período de tiempo apropiado; y
- 15 (d) aislar el polipéptido de interés producido.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el promotor regulable por pH comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo formado por:

- 20 (i) la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 1-501 de SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de SEQ. ID. n° 2 ó 3;
- (ii) una secuencia de ADN que es al menos idéntica en un 60% a una de las secuencias de ADN de (i);
- 25 (iii) una secuencia de ADN que se hibrida con una sonda de ADN de doble cadena que incluye una de las secuencias mostradas en las posiciones 1-501 de SEQ. ID. n° 1, y 1-601 de SEQ. ID. n° 2 ó 3; a baja severidad;
- (iv) una secuencia de ADN que es un fragmento de las secuencias de ADN especificadas en (i), (ii) o (iii).

3. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la condición de pH de la etapa (a) es un valor de pH desde pH 4 hasta pH 7, y el pH se incrementa en la etapa (b) hasta un valor de pH desde 6,5 hasta 9,5.

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, donde la condición de pH de la etapa (a) es un valor de pH desde pH 5 hasta pH 7, y el pH se incrementa en la etapa (b) hasta un valor de pH desde pH 7,25 hasta pH 9,0.

35 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de transcripción por el promotor regulable por pH de la etapa (b) es al menos 3 veces más elevado que bajo la condición de pH de (a), preferiblemente al menos 5 veces más elevado que bajo la condición de pH de (a), y más preferiblemente al menos 10 veces más elevado que bajo la condición de pH de (a).

40 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula de levadura se selecciona entre el grupo formado por *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis*, y una célula *Saccharomyces cerevisiae*, y preferiblemente a partir del grupo formado por *Pichia pastoris*, *Candida utilis* y más preferiblemente una célula *Saccharomyces cerevisiae*.

45 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fermentación en las etapas (a), (b) y (c) se realiza en un tanque de fermentación comprendiendo al menos 100 litros de medio apropiado, preferiblemente en un tanque de fermentación comprendiendo al menos 500 litros de un medio apropiado, y más preferiblemente en un tanque de fermentación comprendiendo al menos 10.000 litros de medio apropiado.

50 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido de interés es un polipéptido apropiado para ser usado para preparar un producto médico.

55 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el polipéptido es insulina humana, hormona de crecimiento humana, colecistoquinina humana, interferón, activador del plasminógeno humano (u-PA), interleucinas 2 y 3, o diferentes tipos de vacunas de subunidades recombinantes.

ES 2 208 001 A1
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universitat Aut3noma de Barcelona
 <120> Procedimiento para la producci3n de un polip3ptido en levaduras
 5 <130> A143873
 <140>
 <141>
 <160> 3
 10 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 501
 <212> ADN
 15 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(501)
 20 <223> SECUENCIA DE ENA1 en direcci3n cadena arriba, desde -800 hasta -300.
 <400> 1
 ttatctcgt cactcttgta cggaaagtgc acctttagcc ccactcccag atcttcaatc 60
 acagaggcaa tgagggtggc tgtgcaatgt aaactttctt atcgcttctt gttatgattg 120
 25 attaccatgc gcggtagaag gattgaatga ggggtgtggg tgtgataatt catgtacgga 180
 ccctttcctc ccagaagctt ctgcacgaag tggttacatt gtgagtacag ggtcttaaac 240
 atcgccgtgc ggcgtcattt tgcggggctc atcatttatt tcctacttct atgacgtttg 300
 ttagggcagg gatgtagatt ttggtcatat actttcacct gacagaagaa aaaacaaggt 360
 30 cttagagcag tattcccgaat ttattgcctc tttccttggg tgggtgcggg ttaatattag 420
 atgaacgggt ggtgtgggtca aaccgggggt aggttttaaa atgtcatgcg ttttcgtcat 480
 ttacatagat atatacaggg a 501

35 <210> 2
 <211> 601
 <212> ADN
 40 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(601)
 45 <223> SECUENCIA DE PHO84 en direcci3n cadena arriba, desde -700 hasta -100
 <400> 2
 taccaaatta tgaataaaaa aaccatatta ttatgaaaag acacaaccgg aaggggagat 60
 cacagacctt gaccaagaaa acatgccaaag aaatgacagc aatcagtatt acgcacggtg 120
 50 gtgctgttat aggegcctta tacgtgcagc atttgctcgt aagggccctt tcaactcatc 180
 tagcggctat gaagaaaatg ttgcccggct gaaaaacacc cgttcctctc actgccgcac 240
 cgcccgatgc caatttaata gttccacgtg gacgtgttat ttccagcacg tggggcggaa 300
 attagcgacg gcaattgatt atggttcgcc gcagtccatc gaaatcagtg agatcgggtc 360
 agttatgcac caaatgtcgt gtgaaaggct ttccttatcc ctcttctccc gttttgcctg 420
 55 cttattagct agattaataaa cgtgcgtatt actcattaat taaccgacct catctatgag 480
 ctaattatta ttcctttttg gcagcatgat gcaaccacat tgcacaccgg taatgccaac 540
 ttagatccac ttactattgt ggctcgtata cgtatatata taagctcatc ctcatctctt 600
 g
 60 601

<210> 3
 <211> 601
 65 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <220>

ES 2 208 001 A1

<221> promoter

<222> (1)..(601)

<223> SECUENCIA PHO89 en dirección cadena arriba, desde -700 hasta -100

5 <400> 3

gtaaagaaca ttagcggaat cgttataatt tcattcctta catccgttta atttcattaa 60
ttogatgcat ctttctttgg cgaagccaga aaatctagtt tcagaaatct cggtttcacc 120
cgcaaaaaag tttaaatttc acagatcgcg ccacaccgat cacaaaacgg cttcaccaca 180
10 aggggtgtgtg gctgtgogat agaccttttt tttctttttc tgctttttcg tcatccccac 240
gttgtgccat taatttgta gtgggccctt aaatgctgaa atattgctaa aaattggccc 300
gagtcattga aaggctttaa gaatataccg tacaaggag tttatgtaat cttataaat 360
tgcatatgac aatgcagcac gtgggagaca aatagtaata atactaatct atcaataacta 420
15 gatgtcacag ccactttgga tccttctatt atgtaaatca ttagattaac tcagtcaata 480
gcagattttt tttacaatgt ctactgggtg gacatctcca aacaattcat gtcactaagc 540
ccggttttcg atatgaagaa aattatataat aaacctgctg aagatgatct ttacattgag 600
g 601

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 208 001

② Nº de solicitud: 200100505

③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.03.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/81

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2000078922 A2 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 28.12.2000, todo el documento.	1,6,8,9
Y		7
Y	ES 8406539 A1 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) 01.08.1984, página 18, líneas 15-23.	7
A	WO 1997044470 A1 (NOVO NORDISK A/S) 27.11.1997	1-4,6,8,9
A	LAMB, T.M.; XU, W.; DIAMOND, A.; MITCHELL, A.P. Alkaline response genes of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and their relationship to the RIM101 pathway. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . Enero 2001, Vol. 276, Nº 3, páginas 1850-1856.	2,6
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 <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 26.04.2004	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/1