

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: 09/10/2008 (51) Int. Cl: C12N 15/00 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: 15/09/2006 C12N 15/09 (2006.01)
(21) Número de solicitud: NL06000069

(71) Solicitante:
INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.
Camino a la Presa San Jose 2055 78126 SAN LUIS
POTOSI San Luis Potosí MX

(72) Inventor(es):
ANA PAULINA BARBA DE LA ROSA
Rincon de los Sauces 156-A SAN LUIS POTOSI San
Luis Potosí 78210 MX
EMILIO MEDINA RIVERO
LEANDRO GABRIEL ORDOÑEZ ACEVEDO
LUZ MARIA TERESITA PAZ MALDONADO
VICTOR EMMANUEL BALDERAS HERNANDEZ
ANTONIO DE LEON-RODRIGUEZ

(74) Representante:
DAVID RIOS JARA
Camino a la Presa San Jose 2055 SAN LUIS POTOSI
San Luis Potosí 78126 MX

(54) Título: SISTEMA PARA EXPRESAR Y TRANSPORTAR PROTEINAS RECOMBINANTES AL PERIPLASMA DE ESCHERICHIA COLI POR VÍA DE SECRECIÓN TAT.

(54) Title: SYSTEM FOR EXPRESSING AND TRANSPORTING RECOMBINANT PROTEINS TO THE ESCHERICHIA COLI PERIPLASM USING THE TAT (TWIN-ARGININE TRANSLOCATION) SECRETION PATHWAY.

(57) Resumen

La presente invención describe un vector de expresión que contiene un péptido señal que utiliza la vía de secreción Tat como alternativa al sistema Sec de secreción para el transporte de citocininas y otras proteínas de interés biotecnológico al periplasma de Escherichia coli. La parte novedosa de esta invención consiste en utilizar el péptido señal de la penicilina acilasa (SPPac) mutado y fusionado al gen sintético de interferón- γ humano (inf.- γ) para el transporte de la proteína al periplasma de Escherichia coli por vía Tat. El SPPac mutado contiene el sitio NdeI en el extremo 5', conteniendo en el vector de expresión pEMR, y en el extremo 3' el codón de triptófano se cambia por el codón de serina y con ello se genera el sitio de restricción Hind III. Se modifican los codones de Leucina y Alanina para generar el sitio NheI. Con ello se generan dos sitios de restricción para la clonación y fusión en fase de genes de proteínas homólogas ó heterólogas. Actualmente, no hay vectores comerciales disponibles para la expresión y transporte de proteínas mediante péptidos señal de vía de transporte Tat.

(57) Abstract

The present invention describes an expression vector which contains a signal peptide using the Tat secretion pathway as an alternative of the Sec secretion system for the transport of cytokinin and further proteins of biotechnological interest to Escherichia coli periplasm. The novel system consists in using the signal peptide of penicillin acylase (SPPac) which is mutated and fused to the synthetic human interferon- γ gene (hINF- γ) for the transport of the protein to the Escherichia coli periplasm using the Tat pathway. The mutated SPPac includes the NdeI site at the 5' end, which is contained in the expression vector pEMR, at the 3' end the tryptophan codon being exchanged by the serine codon, thus generating the restriction site Hind III. The Leucine and Alanine codons are modified so as to generate the NheI site. Thus, two sites for restricting the cloning and fusion within a gene phase of homologous or heterologous proteins are generated. Nowadays there is no commercial vector available for the expression and transport of proteins, which include signal peptides using the Tat pathway.

SISTEMA PARA EXPRESAR Y TRANSPORTAR PROTEÍNAS RECOMBINANTES AL PERIPLASMA DE *Escherichia coli* POR LA VÍA DE SECRECIÓN Tat

5

OBJETO DE LA INVENCION

Actualmente en *Escherichia coli*, no hay vectores comerciales disponibles para la expresión y transporte de proteínas utilizando péptidos señal de la vía de transporte Tat.

10

La presente invención consiste en un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, donde la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat. Esto permite recuperar y purificar la proteína terapéutica en forma más sencilla a la vez que se obtiene con el amino-terminal correcto. En esta invención el péptido señal de la penicilino acilasa (S $Ppac$) mutado, se fusionó al gen sintético humano de interferón- γ (hINF- γ) para transportarlo al periplasma de *E. coli* por la vía Tat. El S $Ppac$ se le agregó el sitio *Nde* I en el extremo 5' y forma parte del vector de expresión pEMR bajo el control del promotor T7; en el extremo 3' se mutó la secuencia para generar los sitios *Hind*III y *Nhe*I, este último se obtuvo mediante el cambio del codón de triptófano por el codón de serina.

20

ANTECEDENTES

El uso de la bacteria Gram negativa *E. coli* como sistema para la producción de proteínas heterólogas, es uno de los más atractivos, debido a la capacidad de esta bacteria de crecer rápidamente en sustratos económicos, su genética es bien conocida y se cuenta con un número importante de vectores y cepas de expresión. Sin embargo, es muy común que la proteína se acumule en el citoplasma en forma de cuerpos de inclusión (Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology. 10: 411-421.). A pesar de esta desventaja sigue siendo uno de los sistemas más utilizados en la industria farmacéutica para la expresión de biofármacos (citocininas y otras), ya que se cuenta con métodos eficientes de solubilización con urea, guanidina-HCl y dodecil sulfato de sodio, entre otros (Tsumoto, K.;

30

Ejima, D.; Kumagai, I. y Arakawa, T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein expression and purification*. 28: 1-8.).

5 La fusión de péptidos señal a las proteínas heterólogas para transportarlas al espacio periplásmico de *E. coli* puede evitar la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma, y en el caso de las proteínas de mamífero con puentes disulfuro, estas se pueden plegar por estar en un ambiente oxidante. También se facilitará la recuperación y la purificación de la proteína heteróloga, ya que en el espacio periplásmico, sólo se encuentran el 4 % de las proteínas de la célula (Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 60: 512-538).

10 El transporte de proteínas a través de las membranas biológicas es crucial para la vida celular. En *E. coli*, existen varias rutas para el transporte de proteínas del citoplasma al periplasma. La vía general de transporte (Sec) es la principal ruta para el transporte de proteínas, en donde, las proteínas no plegadas utilizan energía de la hidrólisis del ATP y un gradiente electroquímico de protones transmembranales. Recientemente se descubrió una vía general de transporte, designada por sus siglas en inglés "twin-arginine translocation" (Tat). La maquinaria Tat utiliza únicamente el gradiente electroquímico de protones transmembranales para llevar a cabo el transporte de proteínas plegadas y que en algunos casos contienen cofactores como FeS, Ni-Fe, centros de molibdoterina (Palmer T., Sargent F. and Berks B.C. 2005. Export of Complex Cofactor-containing Proteins by the Bacterial Tat Pathway. *TRENDS in Microbiology*. 13: 175-180) o grupos hemo (Sturm A., Schierhorn A., Lindenstrauss U., Lilie H and Brüser T. 2006. YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 13972-139978).

25 La vía de transporte Tat se localiza en las membranas de bacterias Gram negativas, Gram positivas, archaeas y en las membranas de tilacoides de los cloroplastos. El sistema de secreción de la bacteria Gram negativa *E. coli*, está constituida por las proteínas TatA, TatB, TatC y TatE. Los genes *tatABC* están organizados en un operón y el gen *tatE* se encuentra fuera de éste. El consenso SRRxFLK de los péptidos señal Tat contienen un par de argininas continuas que son esenciales para el transporte de las proteínas al periplasma (Sargent F., Berks B.C. and palmer T.

30

2006. Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. FEMS Microbiology Letters. 254: 198-207). Sin embargo, existen excepciones como es el caso del péptido señal de la penicilino acilasa en donde el par de argininas está separado por una asparagina. A pesar de este cambio es un péptido señal Tat-dependiente, esto fue demostrado al

5 expresar el gen de la penicilino acilasa con su péptido señal nativo en una cepa de *E. coli* ($\Delta tatA\Delta tatE$), en donde no hubo transporte de la penicilino acilasa. Cuando la penicilino acilasa se fusionó al péptido señal OmpT de la vía Sec, la proteína fue transportada con éxito en una cepa de *E. coli* *tat*⁻ (Ignatova Z., Hömle C., Nurk A. and Kasche V. 2002. Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *E. coli* to the Tat translocation machinery. Biochemical and

10 Biophysical Research Communications. 291: 146-149).

Para demostrar la funcionalidad del *SPPac* mutado se evaluó la producción y transporte de hINF- γ . El Interferón- γ humano (hINF- γ) es secretado por linfocitos estimulados por mitogénesis y está involucrado en la respuesta inmune. En los humanos, el hINF- γ está constituido por 143

15 aminoácidos y tiene un peso molecular entre 20-25 kDa dependiendo del grado de glicosilación, sin embargo, la glicosilación no es necesaria para su actividad biológica. En 1986 el ADN complementario de hINF- γ se clonó y expresó en *E. coli* por primera vez. El hINF- γ tuvo una metionina en el N-terminal y su peso molecular fue de 17 kDa. El hINF- γ está indicado para el tratamiento de cáncer de riñón, cáncer de colon y artritis reumatoide, entre otras (Khalilzadeh R.,

20 Shojaosadati S.A., Maghsoudi N, Mohammadian-Mosaabadi J., Mohammadi M.R., Bahrami A., Maleksabet N., Nassiri-Khalilli M.A., Ebrahimi M. and Naderimanesh H. 2004. Process development for production of recombinant human interferon- γ expressed in *Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 31: 63-69).

25 Existen muy pocos reportes del transporte de proteínas recombinantes al espacio periplásmico de *E. coli* por la vía Tat, entre los que se encuentran:

a) Un estudio donde se demuestra que proteínas eucarióticas complejas como el activador tisular de plasminógeno humano que contiene 17 puentes disulfuro, se transportó eficientemente al

30 periplasma de *E. coli* por la vía Tat utilizando el péptido señal de TorA. Este es el primer reporte en donde una proteína humana se transporta por esta vía (Kim J.Y., Fogarty E. A., Lu F.J., Zhu

H., Wheelock G.D., Henderson L.A. and DeLisa M.P. 2005. Twin-arginine translocation of active human tissue plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 8451-8459).

5 Nuestra invención difiere en que estamos proponiendo una secuencia señal de penicilino acilasa mutante que es diferente a la secuencia TorA.

b) La proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés: GFP) fue utilizada como proteína modelo en estudios de transporte transmembranal, debido a que es fácilmente detectada. El transporte de GFP, utilizando el péptido señal TorA se evaluó por microscopía confocal en diferentes cepas de *E. coli*: silvestre, sobreproductora de IbpAB y mutada *IbpAB*. En este estudio se demostró que el transporte de la GFP vía Tat fue eficiente en las cepas de *E. coli* silvestre y mutada en *IbpAB*, siendo esta última 2 veces mayor la concentración de GFP en el periplasma, debido a que la proteína IbpAB incrementa la expresión de GFP y evita su proteólisis, pero incrementa los niveles de formación de cuerpos de inclusión al 90% (Han M.J., Park S.J., Park T.J. and Lee S.Y. 2004. Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 88: 426-436).

15 Nuestra invención difiere en que estamos proponiendo una secuencia señal de penicilino acilasa mutante que es diferente a la secuencia TorA.

20 Las patentes relacionadas con el tema son:

La patente No. 7,052,867 de los Estados Unidos que se refiere a la invención de un vector de expresión para la secreción de interferón- α humano (hIFN- α), constituido por un polinucleótido modificado que codifica para la secuencia señal de la enterotoxina termoestable II de *E. coli* fusionado a un polinucleótido que codifica a hIFN- α . El proceso es capaz de secretar al periplasma de *E. coli* la forma activa soluble de hIFN- α y carente del residuo adicional de metionina en el N-terminal.

30

Nuestra invención difiere en que nosotros proponemos el uso de un sistema de secreción Tat para el transporte de hINF- γ utilizando el vector pEMR, mientras que la patente anterior utiliza el sistema de secreción Sec para el transporte de hIFN- α .

- 5 La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020110860 se refiere a la descripción de métodos para incrementar la secreción de proteínas en una célula huésped. Preferentemente en microorganismos gram-positivos tal como *Bacillus*, en la bacteria gram-negativa *E. coli*, o en miembros del género *Pantoea*. La secreción podría ser incrementada por la sobreexpresión de proteínas que forman el complejo de la vía Tat, además la secreción de las proteínas podría ser
- 10 selectivamente incrementada por la fusión de un péptido señal tat a la proteína de interés. Preferentemente los péptidos señal phoD o LipA que funcionan por la vía Tat.

Nuestra invención difiere en que nosotros proponemos el uso de un sistema de secreción Tat, utilizando el SPpac de *E. coli* mutado, mientras que en la solicitud de patente anterior proponen

15 el uso de los péptidos señal phoD o LipA de la vía Tat de *Bacillus subtilis* fusionados a un polipéptido heterólogo.

La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020182672 se refiere a la descripción de métodos para incrementar la producción de proteínas secretadas, donde los aminoácidos de las

20 proteínas de interés que tienen una cola de carboxilo no polar, son cambiados o sustituidos del péptido nativo por aminoácidos cargados.

Nuestra invención difiere en que nosotros proponemos el uso de un sistema de secreción Tat, utilizando el SPpac de *E. coli* mutado y en la solicitud de patente anterior proponen adicionar

25 aminoácidos para incrementar el transporte de las proteínas de interés.

La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20030180937 se refiere al aislamiento de péptidos líder capaces de transportar proteínas heterólogas del citoplasma bacteriano. Los métodos, fueron basados en la búsqueda de secuencias de péptidos líder nativos o mutantes en bibliotecas, estos péptidos líder permiten transportar proteínas heterólogas y por lo tanto, la

30 recuperación de la proteína antes que sea degradada en el citoplasma. Los péptidos líder identificados en esta patente muestran significativamente mayor transporte, no solo de proteínas

pequeñas, si no también para proteínas grandes. En esta invención se describen los métodos para el transporte de proteínas plegadas en el citoplasma por la vía Tat.

5 Nuestra invención difiere en que nosotros mutamos el péptido señal *SPpac* mutado de *E. coli* para facilitar la fusión de proteínas homólogas o heterólogas y el transporte por la vía Tat, mientras que en la solicitud de patente anterior proponen utilizar un péptido señal aislados de una biblioteca para transportar proteínas heterólogas vía Tat.

10 La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20030219870 se refiere a la invención de métodos, para producir polipéptidos heterólogos con múltiples puentes disulfuro y transportarlos por la vía Tat. También se describe, la selección de polipéptidos a partir de bibliotecas, para secretarlos por la vía Tat, y métodos para mejorar la producción de polipéptidos heterólogos que tengan al menos un puente disulfuro.

15 Nuestra invención difiere en que nosotros proponemos el uso de un sistema de secreción Tat para el transporte de cualquier proteína homóloga o heteróloga, mientras que en la solicitud de patente anterior proponen transportar polipéptidos heterólogos con múltiples puentes disulfuro vía Tat.

20 La patente de Weltorganisation für geistiges Eigentum No. WO 2004/108932 A1, se refiere al incremento de los niveles de secreción de proteínas, sobreexpresando la proteína SecA, además describen un método para la producción de proteínas.

25 Nuestra invención difiere en que nosotros proponemos el uso de un sistema de secreción Tat para el transporte de proteínas por vía Tat, mientras que en la patente anterior proponen incrementar los niveles de secreción sobreexpresando una proteína de la vía de transporte Sec.

Con respecto a la producción de hIFN- γ :

30 La patente de los Estados Unidos No. 6,046,034 se refiere a nueva variante de interferón- γ humano recombinante (hIFN- γ), vectores y células huésped para su producción, así como, métodos para su empleo terapéutico. Las variantes son la sustitución de uno o más pares de los

siguientes aminoácidos seleccionados: Glu8-Ser70, Ala18-His112, Lys81-Leu121 y Gln49-Leu96 por pares de residuos de Cys, y opcionalmente por la remoción de uno a diez residuos de aminoácidos del C-terminal de hIFN- γ . Las variantes de la invención mostraron mayor termoestabilidad y no perdieron su actividad biológica comparada hIFN- γ .

5

Nuestra invención difiere en que nosotros utilizamos un gen completamente sintético, donde los codones fueron optimizados para su traducción en *E. coli*, dando como resultado una proteína 100% equivalente a la humana, mientras que la patente anterior protege una proteína con mutaciones puntuales.

10

La patente de los Estados Unidos No. 6,083,724 se refiere al aislamiento de un cADN de pollo que corresponde a IFN- γ que es expresado como proteína recombinante y utilizado en el tratamiento de enfermedades de aves .

15

Nuestra invención difiere en que utilizamos un gen completamente sintético, donde los codones fueron optimizados para su traducción en *E. coli*, dando como resultado una proteína 100% equivalente a la humana, mientras que la patente anterior protege un cADN que codifica a IFN- γ de pollo.

20

La patente de la organización mundial de la propiedad intelectual No. de publicación internacional WO 2004/050702 A2 se refiere a nuevos marcos de lectura abiertos del genoma humano, donde al menos uno tiene actividad de hIFN- γ .

25

Nuestra invención difiere en que utilizamos un gen completamente sintético, donde los codones fueron optimizados para su traducción en *E. coli*, dando como resultado una proteína 100% equivalente a la humana, mientras que la patente anterior protegen marcos de lectura abiertos del genoma humano.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el vector de expresión pEMR. Las abreviaciones SP*pac*, Amp, pBR322
origen pT7 significan: péptido señal de la penicilino acilasa mutado, gen de resistencia a
5 ampicilina, origen de replicación para *E. coli* y promotor T7 respectivamente. En el recuadro
superior se muestra la secuencia de nucleótidos, aminoácidos y los sitios de restricción *Nde*I,
*Hind*III, *Nhe*I, *Xho*I y *Bam*HI del SP*pac*.

La Figura 2 ilustra las cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pEMR-INF- γ reportada en
10 densidad óptica (OD) a 620 nm, el consumo de glucosa en la gráfica del inciso A) y la
producción de hINF- γ reportada como la intensidad de las áreas en milímetros (INT*mm)
obtenidas de un ensayo de Western blot en la gráfica del inciso B).

La Figura 3 muestra el análisis de Western blot de hINF- γ maduro en la fracción periplásmica,
15 fracción soluble e insoluble de la célula, así como el gráfico de barras correspondiente a los
porcentajes de hINF- γ en cada una de las fracciones. Las letras P, S e I significan fracción del
periplasma, fracción soluble y fracción insoluble, respectivamente.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En esta invención el vector de expresión pEMR ofrece una alternativa para el transporte de
proteínas recombinantes al periplasma por la vía Tat de *E. coli*, utilizando el péptido señal de la
25 penicilino acilasa mutado. Las mutaciones realizadas en el péptido señal nativo de la penicilino
acilasa, fueron con la intención de generar sitios de restricción para facilitar la clonación y fusión
del péptido señal a diversos genes homólogos o heterólogos.

Las mutaciones realizadas en la secuencia del péptido señal fueron las siguientes:

30

- 1) La adición de los nucleótidos CAT al inicio de la secuencia para generar el sitio de
restricción *Nde*I (CATATG) en la secuencia de SP*pac* y generar el vector pEMR. La

ventaja de tener este sitio al inicio, es que, contiene el codón de inicio ATG que codifica para metionina (M).

- 5 2) El cambio del nucleótido G situado en la posición 60 por una A para generar el sitio de restricción *HindIII* (AAGCTT), debido a este cambio, el codón que codifica para el aminoácido triptófano (W) cambio a serina (S). En este sitio se podrían fusionar genes a los que previamente se les ha adicionado la secuencia 3' del péptido señal con oligonucleótidos específicos por el método de PCR.
- 10 3) El cambio del nucleótido A de la posición 72 por una G, para generar el sitio *NheI* (GCTAGC).
- 15 4) El cambio del nucleótido G de la posición 75 por una A, al igual que en el punto anterior para generar el sitio *NheI* (GCTAGC). Este es otro sitio que puede ser utilizado para fusión de genes heterólogos.

Por el método de PCR se adicionaron al gen sintético de hINF- γ los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI*, este producto de PCR se clonó el plásmido pCRII-TOPO, posteriormente se subclonó el fragmento *HindIII*-hINF- γ -*BamHI* en el vector de expresión pEMR como se muestra en la Figura 1, utilizando los mismos sitios de restricción, con la finalidad de fusionar el péptido señal mutado de la penicilino acilasa al gen hINF- γ el plásmido resultante se nombró pEMR-hINF- γ . Con esta construcción se transformó la cepa *E. coli* BL21-SI de Invitrogen (patente de los Estados Unidos No. 5,830,690), en donde la sobreexpresión de genes clonados bajo el promotor T7 es fuertemente inducida con cloruro de sodio, debido a que la ARN polimerasa T7 está bajo el control del promotor de choque osmótico *proU* (Bhandari P. and Gowrishankar J. 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *Journal of Bacteriology*. 179: 4403-4406). La cepa recombinante se denominó *E. coli* BL21-SI/pEMR-hINF- γ .

30 La expresión de hINF- γ a partir de *E. coli* BL21-SI/ pEMR-hINF- γ se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio mínimo B5g, con 5 g/L de glucosa como fuente de

carbono, a 37°C, pH 7 y una agitación de 200 rpm. El cultivo se indujo con 0.3 M de NaCl a una OD_{620nm} de 0.6, se tomaron muestras durante el tiempo de cultivo, para determinar el crecimiento (OD_{620nm}), consumo de glucosa y producción de hINF-γ. Las cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa mostraron un perfil típico de *E. coli* como se observa en la Figura 2.

5

El Western blot para identificar el hINF-γ mostró que toda la proteína se encuentra en su forma procesada, debido a que las bandas coinciden con el peso molecular de 17.5 kDa del hINF-γ de un estándar y no se observó la preproteína de 21 kDa. Por densitometría se obtuvieron las áreas de las bandas obtenidas en el Western blot y se construyó una cinética de producción de hINF-γ.

10 La producción máxima fue a las 12.5 horas después de haber iniciado el cultivo.

Las proteínas de la fracción del periplasma, la fracción soluble y la fracción insoluble del citoplasma fueron obtenidas por el siguiente método: 1.5 mL de células procedentes de un cultivo con una OD_{620nm} de aproximadamente 2 se centrifugó a 8,000 x g durante 2 minutos, el paquete celular obtenido se resuspendió en 200 μL de amortiguador de choque osmótico (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, 20 % de sacarosa p/v y EDTA 1.0 mM) y se incubó durante 5 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó a 8,000 x g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue rápidamente resuspendido en 200 μL de agua destilada con agitación vigorosa e incubado por 5 minutos más en hielo. La fracción del periplasma fue colectada después de

15

20

25

centrifugar a 16,000 x g durante 2 minutos. Los protoplastos fueron resuspendido en 200 μL y sonificado en hielo durante 30 segundos, posteriormente se centrifugó a 16,000 x g durante 2 minutos el sobrenadante se colectó (fracción soluble del citoplasma) y el paquete celular se lavó 2 veces con agua destilada y finalmente se resuspendió en 200 μL de agua destilada (Robbens J., De Coen W, Fiers W. and Remaut E. 2006. Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in *Escherichia coli* through a single amino acid change at the cleavage site. *Process Biochemistry*. 41: 1343-1346).

Se separaron las proteínas de cada una de las fracciones (10 μL) en un gel de poliacrilamida-SDS con un gradiente de 4-20 %, para evaluar el transporte de hINF-γ recombinante, por la vía Tat. El hINF-γ se distribuyó de la siguiente forma: 5.34 % se encontró en la fracción del periplasma, 2.86

30

% en la fracción soluble y 91.80 % en la fracción insoluble del citoplasma como se observa en la Figura 3.

5 Para que la proteína sintetizada sea transportada al espacio periplásmico se requiere de determinadas secuencias señal (Olins, P. O. and Lee, S. C. 1993. Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology. 4: 520-525). Sin embargo, actualmente no hay vectores comerciales de expresión de proteínas que contengan péptidos señal para transportar proteínas por la vía Tat. En esta invención proponemos el *SPPac* mutado como una alternativa rentable para el transporte de eficiente de proteínas
10 humanas o de interés biotecnológico.

Se muestra a continuación la secuencia de ADN del péptido señal de la penicilino acilasa mutado y fusionado al gen sintético optimizado de hINF- γ . El péptido señal indicado con una flecha, contiene los sitios de restricción *NdeI*, *HindIII* y *NheI*; mientras que al final de la secuencia
15 correspondiente al hINF- γ contiene un sitio *BamHI* para la clonación.

20

25

30

HaeI
 CATATGAAAATAGAAATCGTATGATCGTGAACGTGTCTTCTGCTTCCCAGATGATTATTCAACCTTACCTCCCTAGCTCAGGACCCA
 5
 10 20 30 40 50 60 70 80 90
 →
 Secuencia del péptido señal mutado de la penicilino acilasa

TACOTCAAAGAGCGTGAAGATTAAAAAATACTTCAACCCAGTCATTCCGATGTCGCCGATAGCCTACACTTTTITAGGTATTTEA
 10
 100 110 120 130 140 150 160 170 180

AAAAATCGAAAGAGAAATCTGACCGTAAATCATGCCAGTCAAAATTTCTTCTCTCTATTTAAACTGTGTAAAAATTTAAAGACCAT
 15
 190 200 210 220 230 240 250 260 270

CACCTCATCCAAAATCCGTAGAACTATTAAAGAGATATGAAATCTTAAATCTTTAGCCCAATAAAAAAGCGTCATGACTTTGAG
 20
 280 290 300 310 320 330 340 350 360

AAATTAACTAATATATTTACCGACTTAACTCCAACTAAAGCCATCCACDAATDATTCAAGTCAATGCCAAGACTGCCACCAACA
 25
 370 380 390 400 410 420 430 440 450

CCGAAACTCGTAAAGCTAAAGCTTCCCAAATGCTGTTCTGCTGCTGCTGCAAGTCAGTAAGCATCC
 30
 460 470 480 490 500 510
 BamHI

En seguida se muestra el cambio del aminoácido triptófano (**W**) de la posición 20 por serina (**S**) de la secuencia de aminoácidos del péptido señal de la penicilina acilasa.

Péptido señal nativo: MKNRNRMIVNCVTASLMYY**W**SLPALA

5

Péptido señal mutado: MKNRNRMIVNCVTASLMYY**S**SLPALA

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, caracterizado porque el gen de la proteína recombinante está fusionado a la secuencia del péptido señal de la penicilino acilasa mutado contenido en el vector de expresión pEMR, y la proteína recombinantes es exportada al espacio periplásmico utilizando sistema de secreción Tat.
- 10 2. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR, y los sitios de clonación como *HindIII*, *NheI*, *XhoI*, *BamHI* pueden ser utilizados.
- 15 3. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR, donde la proteína transportada es el hINF- γ fusionado al péptido señal de la penicilino acilasa mutado bajo el control del promotor T7.
- 20 4. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1, 2 y 3 caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR, y otros promotores para el control de la expresión como el promotor *ara* de arabinosa, el promotor *trp* de triptófano y el promotor *lac* y sus derivados que utilizan lactosa pueden ser
25 utilizados.
- 30 5. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR, donde la expresión y transporte del gen del hINF- γ fusionado al péptido señal de la penicilino acilasa mutado se realiza en la cepas *E. coli* BL21-SI.

- 5 6. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR, y otras cepas de *E. coli* conteniendo el gen de la T7 RNA polimerasa pueden ser utilizadas como BL21(DE3), Rosseta, Origami, JM101(DE3).
- 10 7. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR y se utiliza el hINF- γ para evaluar la eficiencia del péptido señal de la penicilino acilasa mutado.
- 15 8. Un sistema de producción de proteínas terapéuticas en *Escherichia coli*, según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la proteína es exportada al espacio periplásmico utilizando el sistema de secreción Tat del plásmido pEMR y otras proteínas homólogas o heterólogas pueden ser fusionadas para su transporte y procesamiento.
- 20
- 25
- 30

RESUMEN

La presente invención describe un vector de expresión que contiene un péptido señal que utiliza la vía de secreción Tat como alternativa al sistema Sec de secreción para el transporte de citocininas y otras proteínas de interés biotecnológico al periplasma de *Escherichia coli*. La parte novedosa de esta invención consiste en utilizar el péptido señal de la penicilino acilasa (SP_{pac}) mutado y fusionado al gen sintético de interferón- γ humano (hINF- γ) para el transporte de la proteína al periplasma de *Escherichia coli* por la vía Tat. El SP_{pac} mutado contiene el sitio NdeI en el extremo 5', contenido en el vector de expresión pEMR, y en el extremo 3' el codón de triptófano se cambia por el codón de serina y con ello se genera el sitio de restricción Hind III. Se modifican los codones de Leucina y Alanina para generar el sitio NheI. Con ello se generan dos sitios de restricción para la clonación y fusión en fase de genes de proteínas homólogas ó heterólogas. Actualmente, no hay vectores comerciales disponibles para la expresión y transporte de proteínas mediante péptidos señal de la vía de transporte Tat.

Figura 1

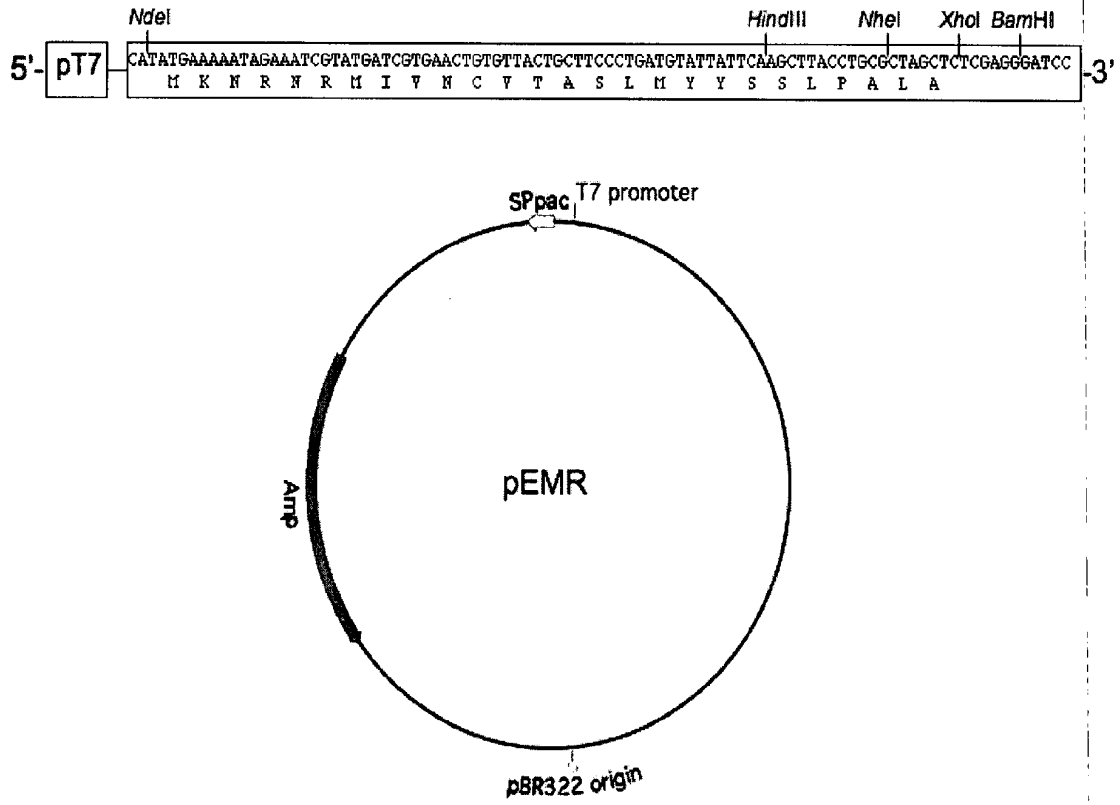


Figura 2

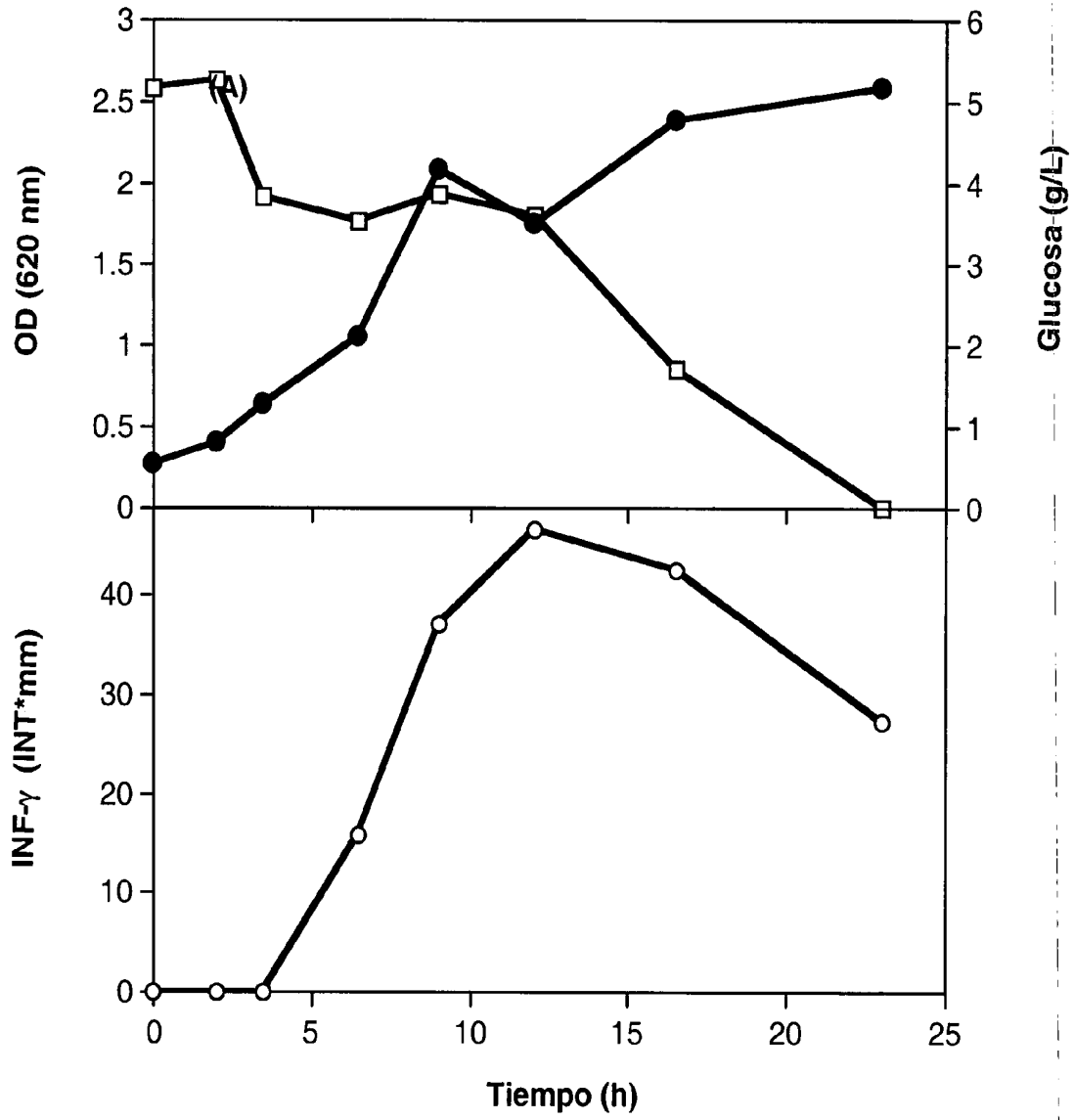


Figura 3

