



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 365 540**

⑤① Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **02785614 .5**
⑨⑥ Fecha de presentación : **05.12.2002**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1451223**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

⑤④ Título: **Control de expresión usando secuencias intergénicas variables.**

③⑩ Prioridad: **05.12.2001 GB 0129105**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

⑦③ Titular/es: **UCB Pharma, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

⑦② Inventor/es: **Popplewell, Andrew, George**

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 540 T3

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

DESCRIPCION

Control de expresión usando secuencias intergénicas variables

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de producción de anticuerpos en los que las cadenas pesadas y ligeras de una molécula de anticuerpo concreto se codifican por el DNA presente en un mensaje dicistrónico en el que los dos cistrones están enlazados por una secuencia intergénica optimizada.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de los anticuerpos para reconocer antígenos específicos los ha hecho herramientas muy útiles y eficaces en medicina y biotecnología. Se han usado anticuerpos específicos para antígenos en tipos seleccionados de célula para dirigir estos anticuerpos a la célula seleccionada. Se ha descubierto que el enlace de anticuerpos a receptores en células afecta en algunos casos a la función de la célula. También se han conjugado a anticuerpos agentes terapéuticos y de diagnóstico para dirigir específicamente estos agentes a células seleccionadas. Esta técnica se ha usado particularmente en células cancerosas como objetivo. También se han usado anticuerpos para dirigirlos a antígenos en células infectadas vírica y bacteriológicamente, tales como el TNF α , o para usarlos en ensayos. En biotecnología los anticuerpos tienen muchos usos, tales como sondas, en purificación y en catálisis.

15 Las moléculas de anticuerpos consisten globalmente en cuatro cadenas polipeptídicas - dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Cada cadena comprende dominios tanto variables como constantes. Las cadenas ligeras comprenden dos dominios: V_L y C_L, mientras que las cadenas pesadas comprenden al menos cinco dominios: V_H, C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3} y uno opcional C_{H4}. Las cuatro cadenas están siempre organizadas del mismo modo general: las dos cadenas pesadas están enlazadas conjuntamente por al menos un enlace disulfuro y cada cadena pesada está también enlazada a una de las cadenas ligeras por un enlace disulfuro de manera que ambas cadenas ligeras están enlazadas a una cadena pesada diferente.

20 Las moléculas de anticuerpos tienen aproximadamente forma de Y y consisten fundamentalmente en dos partes funcionales principales. La primera parte funcional es responsable del reconocimiento de antígenos específicos y está formada por la parte superior de los brazos de la Y. La región de unión al antígeno en cada parte comprende un dominio V_H y un dominio V_L. Cada dominio variable contiene tres regiones hipervariables que, junto con las tres regiones hipervariables de la otra cadena, forman el sitio de unión al antígeno. Estas regiones hipervariables se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Las CDRs, que forman lazos, están soportadas sobre regiones de armazón. Debido a su variabilidad entre anticuerpos, las regiones que comprenden V_H y V_L se conocen como regiones 'V'.

25 La segunda parte funcional es responsable de desencadenar las funciones efectoras de otras células que dispondrán del antígeno reconocido por el anticuerpo y está formada por las partes inferiores de los brazos y el tallo de la Y. Esta región se conoce como la región constante 'C' debido a su relativa constancia. Comprende los dominios C_L y todos los dominios C de las cadenas pesadas.

30 Hay dos tipos de cadena ligera: κ y λ , y cinco tipos de cadena pesada: α , δ , γ , ϵ y μ . La clase de anticuerpo está determinada por el tipo de cadena pesada que tiene: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM respectivamente.

Los fragmentos de anticuerpo, en los que se ha separado parte de su región constante por escisión enzimática, se usan también en medicina y biotecnología. Estos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

35 Se sabe dirigir la producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (que tienen una especificidad antigénica particular) fusionando una célula de bazo productora de anticuerpos con una célula de mieloma, dando por resultado un hibridoma (Kohler, G. and Milstein, C. Cultivos continuos de células fusionadas secretoras de anticuerpo de especificidad predefinida. Naure, 256, 495-497 (1975)). Sin embargo, tales anticuerpos son inadecuados para usar en terapia humana porque son inmunogénicos en humanos. La mayoría de los anticuerpos monoclonales son producidos por células no humanas.

40 Se han desarrollado técnicas de DNA recombinante que permiten que las propiedades útiles de más de un anticuerpo se combinen para producir un nuevo anticuerpo. La producción de anticuerpos quiméricos, en los que el sitio de unión al antígeno que comprende la región V completa de un anticuerpo se enlaza a la región constante de un anticuerpo diferente, se describe en los documentos EP-A-0120694 (Celltech Limited), EP-A-0125023 (Genentech Inc. and City of Hope), EP-A-0171496 (Research Development Corporation, Japan), EP-A-0173494 (Stanford University) y WO-A-86/01533 (Celltech Limited).

45 El documento WO-A-86/01533, por ejemplo, describe la preparación de un anticuerpo quimérico en el que regiones V de muridos se unen a regiones constantes de humanos. Sin embargo, la gran proporción de residuos en anticuerpos quiméricos no humanos/humanos que se derivan del donante no humano da por resultado la posibilidad de que el anticuerpo provoque una respuesta inmunológica potencialmente perjudicial, en particular si se administra a lo largo de un periodo prolongado (Begent et al., Br. J. Cancer, 62,487 (1990)).

"Humanización" de anticuerpos es una técnica que hace que los anticuerpos quiméricos no humanos/humanos se muestren más semejantes a los anticuerpos humanos para el sistema inmune humano y se ha desarrollado en un intento para superar la respuesta inmunológica no deseada mencionada anteriormente. El documento EP-A-0239400 (Winter) describe cómo, en vez de usar una región variable completa de muridos, se injertan las CDRs de un anticuerpo monoclonal de muridos en las regiones de armazón de los dominios variables de un anticuerpo humano. Así, son de muridos solo las CDRs que forman el dominio mismo de enlace al antígeno y los otros residuos son humanos.

Reichmann et al., ("Remodelación de anticuerpos humanos para terapia", Nature, 332, 323-324, 1988) descubrió que es conveniente convertir otros residuos humanos del dominio variable en sus homólogos del donante no humano para mejorar la actividad de unión al antígeno. Un tal residuo se encontró en la posición 27 de la cadena pesada humana, que, cuando se transformó de serina humana en el correspondiente residuo de rata (fenilalanina) dio por resultado una capacidad mejorada de unión al antígeno. Otro tal residuo se descubrió en la posición 30. Sin embargo, una construcción que contenía un cambio de serina humana a tirosina de rata en la posición 30 de la cadena pesada además del cambio en la posición 27 mencionado anteriormente no tuvo una actividad enlazante significativamente alterada sobre el anticuerpo humanizado con el cambio de serina a fenilalanina en la posición 27 solamente.

Los residuos de cadena pesada 27 y 30 están dentro del lazo estructural adyacente a CDR1. Queen et al., (WO 90/07861) conjeturaron que otros residuos que interaccionan con las CDRs son también importantes en la determinación de la afinidad de unión al antígeno. Teniendo esto en cuenta, Queen et al., propusieron cuatro criterios para determinar qué residuos deben proceder del donante y cuáles del aceptor cuando se diseñan anticuerpos humanizados. En un análisis más definitivo, Adair et al., (documento WO 91/09967) revelaron una jerarquía de números de residuos que permitirá diseñar un anticuerpo humanizado.

Se han publicado una serie de reseñas que exponen los anticuerpos injertados con CDR, que incluyen Vaughan et al., (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

Se han descrito también conjugados de anticuerpos en los que la región constante se ha fusionado con moléculas efectoras o reporteras que pueden actuar como agentes terapéuticos o de diagnóstico (documentos WO 95/01155, US 3927193, US 4331647, US 4348376, US 4361544, US 468457, US 4444744, US 4460459 y US 4460561 y reseñas por Waldmann, T.A., Science, 252, 1657, (1991); Koppel, G.A., Bioconjug. Chem., 1, 13, (1990); Oeltmann, T.N. and Frankel, A.E., FASEB J., 5, 2334, (1991); y van den Bergh, H.E., Chemistry in Britain, Mayo 1986, 430-439).

Se sabía producir anticuerpos normales, quiméricos o humanizados transfectando una célula huésped adecuada con dos vectores de expresión, uno que contiene una secuencia de DNA que codifica la cadena pesada y uno que contiene una secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo requerido (documento WO-A-91/09967). Alternativamente, se sabía transfectar una célula huésped con un vector de expresión que contiene tanto la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada como la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo requerido. En el último ejemplo, las secuencias de DNA que codifican la cadena pesada y la cadena ligera están bajo el control de sus propios promotores individuales (documento WO-A-91/09967) o están presentes en un mensaje dicistrónico (Better, M., Paul Chang, C., Robinson, R.R. y Horwitz, A.H. Escherichia coli: Secreción de un Fragmento de Anticuerpo Quimérico Activo. Science, 240, 1041-1043 (1988)).

Se usó un mensaje dicistrónico por Better et al. para producir un anticuerpo L6 Fab de ratón quimérico dirigido hacia un antígeno gangliósido expresado sobre la superficie de muchos carcinomas humanos. En este caso se eligió un mensaje dicistrónico en un intento para garantizar que tanto las cadenas pesadas truncadas (Fd) como las cadenas ligeras κ sean traducidas en estrecha proximidad física de manera que se ensamblen correctamente y se segreguen. Los mensajes dicistrónicos son capaces solamente de funcionar en bacterias mientras que el concepto de "un gen, un promotor" funciona tanto en mamíferos como en bacterias. En un mensaje dicistrónico, un promotor está asociado solamente con el primer cistrón. El segundo cistrón se transcribe por la "ultralectura" de las polimerasas al segundo cistrón tal que ambos cistrones están representados por una sola molécula de RNA. Los dos cistrones de DNA codificantes están separados por un segmento de DNA conocido como una "secuencia intergénica" o "IGS". Esta región de IGS está presente también en la molécula de RNA que se transcribe del DNA. El documento WO 01/94585 describe secuencias intergénicas IGS1 a IGS4 para la expresión de Fab' en *E. coli*.

La optimización de la velocidad de iniciación de traducción se ha reconocido durante algún tiempo como fundamental para la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas segregadas en *E. coli* (Simmons, L. y Yansura, D. Nature Biotech, 14, 629-634 (1996)). Sin embargo, diferentes fragmentos Fab's tienen armazones y secuencias CDR diferentes que confieren propiedades diferentes a la molécula, incluyendo diferencias en la facilidad (o velocidad) de plegamiento en el periplasma de *E. coli* (Knappik, A. y Pluckthun, A. Prot Eng 8, 81-89 (1995)). Por ejemplo, un Fab' que se pliega en su conformación nativa fácil y rápidamente en el periplasma de *E. coli* es probable que sea "tolerado" en un alto nivel y la traducción rápida se pueda acomodar para conseguir acumulación en alto nivel. Un Fab' que se pliega peor es probable que sea tolerado peor por la bacteria huésped si es traducido rápidamente, saturando potencialmente la maquinaria de plegamiento/secreción del huésped y teniendo un efecto perjudicial en la fisiología de la célula huésped.

Así, cuando se producen anticuerpos usando un sistema de vectores de expresión en célula huésped, se puede tolerar un alto nivel de expresión de un anticuerpo particular, pero para un anticuerpo diferente un alto nivel de expresión podría resultar tóxico para la célula, tal vez a causa de eficacias diferentes de secreción o plegamiento.

5 El nivel de expresión de un anticuerpo concreto está determinado por la cantidad presente de cadenas pesadas y ligeras. Para producción máxima, la relación de cadenas pesadas a cadenas ligeras debe estar equilibrada, tal como cantidades iguales de ambas. Sin embargo, si la cadena pesada o ligera está presente en una cantidad menor, esto limitará la cantidad de anticuerpo producido. La acumulación de cadena pesada en exceso es probable que sea particularmente mal tolerada.

10 En el caso de un anticuerpo codificado por un mensaje dicistrónico, el cistrón anterior puede contener el DNA que codifica la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo con una particular especificidad de antígeno. El cistrón posterior codificaría después la respectiva cadena ligera o cadena pesada compañera. Sería conveniente que el nivel de expresión de la cadena de anticuerpo correspondiente al DNA codificante en el cistrón posterior de un mensaje dicistrónico pueda ser regulado para producir el deseado nivel de expresión para un anticuerpo concreto.

15 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un mensaje dicistrónico para producir una molécula de anticuerpo con una particular especificidad de unión al antígeno, en el que el cistrón anterior contiene DNA que codifica para la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón posterior contiene DNA que codifica para la correspondiente cadena ligera o cadena pesada respectivamente, caracterizado porque los dos cistrones están unidos por una secuencia intergénica optimizada (IGS) y donde el anticuerpo producido no es un anticuerpo anti-TNF α (por ejemplo, ver el documento PCT/GB01/02477) o un anticuerpo receptor (anti-KDR) que contiene dominios de inserción de quinasa anti-humana (por ejemplo, ver el documento PCT/GB02/004619).

Preferiblemente, el cistrón anterior codifica para la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón posterior codifica para la correspondiente cadena pesada.

25 La IGS se ha optimizado para ajustar el nivel de expresión de la cadena de anticuerpo correspondiente al cistrón posterior en el mensaje dicistrónico con el fin de conseguir el nivel de expresión deseado para el anticuerpo concreto.

La invención está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

30 En esta especificación, la longitud de la IGS está definida como el número de nucleótidos entre el codón de terminación del cistrón anterior y el codón de iniciación del cistrón posterior (no inclusive). La longitud de la IGS está implicada en la determinación de la velocidad de traducción de la parte del RNA que corresponde al cistrón posterior. Por ejemplo, una secuencia intergénica corta puede dar por resultado un acoplamiento muy ajustado de traducción entre las cadenas pesadas y las ligeras, y que el ribosoma traductor puede no disociarse completamente del mRNA tras completar la síntesis de la cadena de anticuerpo codificada por el cistrón anterior antes de iniciar la síntesis de la cadena de anticuerpo codificada por el cistrón posterior (Adhin, M. y van Duin, J. J. Mol. Biol., 213, 811-818 (1990); Andre, A. et al., FEBS Letts., 468, 73-78 (2000)). Tal procedimiento, llamado reiniciación de traducción, ocurrirá solamente si el codón de terminación del gen anterior está muy próximo al codón de iniciación del gen posterior. Debido a consideraciones cinéticas, esto dará por resultado mayor expresión del polipéptido codificado por el cistrón posterior puesto que la traducción no requerirá que un ribosoma se una a la molécula de mRNA en su IGS.

Si hay demasiada separación entre los dos genes, el ribosoma se disociará tras la terminación de la síntesis del cistrón anterior, requiriendo un nuevo ribosoma para iniciar la traducción del cistrón posterior. En general, esto reducirá la eficacia de la iniciación de traducción.

45 La presencia de un sitio Shine Dalgarno (SD) de unión al ribosoma (complementario a 16S RNA) en la IGS permite a un ribosoma unirse a esta secuencia IGS y traducir el cistrón posterior. Cuando la distancia entre cistrones es suficientemente corta para permitir que ocurra la reiniciación de traducción, hay alguna evidencia para sugerir que la presencia de un sitio SD en el cistrón anterior puede aumentar la eficacia de la iniciación de traducción del cistrón posterior (Spanjaard, R.A. y van Duin, J. Nucl. Acids Res., 17, 5501-5507 (1989)).

50 Hay varias características del sitio SD y de la secuencia nucleotídica entre el final del sitio SD y el codón de iniciación AUG que tienen una influencia sobre la fuerza de iniciación de traducción (reseñado en Makrides, S. Microbiol. Revs., 60, 512-538 (1996)). La distancia entre el sitio SD y el codón de iniciación AUG del cistrón posterior es una de tales características, como es la "fuerza" del sitio SD mismo. Un sitio SD que es 100% complementario a la secuencia de 16S RNA que se une a él dará en general por resultado mayor expresión que si el sitio SD es solo parcialmente complementario a la secuencia de 16S RNA.

55 La secuencia de la región entre la secuencia SD y el codón de iniciación es otro determinante importante de la velocidad de traducción del cistrón posterior. La distancia y secuencia afectan a la estructura secundaria potencial

- del mRNA alrededor del codón de iniciación (reseñado en Makrides, S. Microbiol. Revs., 60, 512-538 (1996)). El codón de iniciación debe estar en un "lazo" y no limitado en un "tallo", aunque lo contrario se aplica a la secuencia SD. Por tanto, modificando la secuencia y longitud de la IGS es posible modificar la amplitud del acoplamiento de traducción y/o la fuerza de iniciación de traducción y por tanto el nivel de traducción del cistrón posterior y la subsiguiente velocidad de acumulación de la cadena de anticuerpo que codifica.
- 5 La IGS del mensaje dicistrónico de la presente invención se ha modificado con respecto a la longitud, secuencia y estructura secundaria de manera que se consigue acoplamiento óptimo de traducción de los dos cistrones.
- La secuencia óptima IGS para usar en la presente invención se puede determinar empíricamente usando el método siguiente. El método comprende construir una serie de vectores de expresión adecuados que contienen una serie de variantes IGS en los se pueden insertar moléculas de anticuerpos para probar. La prueba empírica de cada secuencia IGS para cada anticuerpo se puede conseguir transformando el vector de expresión en un huésped adecuado y analizando la expresión de anticuerpo y rendimiento. La serie de secuencias IGS descritas en la presente solicitud, que varían en longitud y secuencia, se pueden usar para construir tales vectores de los que se puede seleccionar la secuencia óptima IGS para una molécula de anticuerpo concreto. Dichas secuencias incluyen secuencias IGS 1-4.
- 10 15
- En una realización preferida, la IGS se ha optimizado de manera que se consigue la expresión máxima de la cadena de anticuerpo codificada por el cistrón posterior. Esto da por resultado un nivel máximo de expresión del anticuerpo concreto porque la cantidad de la cadena de anticuerpo codificada por el cistrón posterior no es limitante.
- En otra realización más, la IGS se ha optimizado de manera que la velocidad de iniciación de traducción para la traducción del cistrón posterior es lo más alta posible.
- 20
- En otra realización más, la IGS se ha optimizado de manera que la velocidad de iniciación de traducción para la traducción del cistrón posterior no está en el mayor grado posible realizable.
- En otra realización más, la IGS se ha optimizado de manera que la velocidad de iniciación de traducción para la traducción del cistrón posterior está en un grado bajo.
- 25
- El mensaje dicistrónico de la presente invención codifica para la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de anticuerpo concreto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo global o en particular un fragmento suyo, tal como un fragmento Fab o Fab'. El anticuerpo puede ser también un anticuerpo quimérico o humanizado.
- El mensaje dicistrónico de la presente invención puede comprender DNA sintético, cDNA o DNA genómico, o una combinación de ellos.
- 30
- La secuencia de DNA codificante para un anticuerpo concreto se puede obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de DNA que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de DNA determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.
- Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de DNA que codifican las cadenas pesadas y ligeras de moléculas de anticuerpo específico a enlazar por la IGS en un mensaje dicistrónico de la presente invención. Las secuencias de DNA deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.
- 35
- El mensaje dicistrónico de la presente invención puede contener una secuencia de DNA que codifica una proteína efectora o reportera que se fusiona con la secuencia de DNA que codifica una de las cadenas de anticuerpo.
- 40
- El mensaje dicistrónico de la presente invención puede contener también una secuencia de DNA que codifica un enlace peptídico que se fusiona con la secuencia de DNA que codifica una de las cadenas de anticuerpo de manera que permitirá la subsiguiente unión de una proteína o molécula efectora o reportera al anticuerpo expresado a partir del mensaje dicistrónico.
- 45
- El mensaje dicistrónico de la presente invención puede contener también una secuencia de señal secretora que se fusiona en la parte anterior de la secuencia de DNA que codifica una o ambas cadenas de anticuerpo con el fin de permitir dirigir las cadenas de anticuerpo al periplasma o a la parte externa de la célula.
- Preferiblemente, la secuencia de señal secretora es una secuencia peptídica OmpA.
- 50
- En un segundo aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que contiene un mensaje dicistrónico de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.
- Preferiblemente, la cadena principal del vector de expresión es pTTO. El vector de expresión pTTO se diseña para dar lugar a una acumulación soluble periplásmica de proteínas recombinantes en *E. coli*. Este vector tiene las siguientes características principales:

(i) Marcador de resistencia a la tetraciclina - antibiótico no inactivado por el producto del gen de resistencia, por tanto la selección para células que contienen plásmido se mantiene;

(ii) Bajo número de copias - origen de replicación derivado del plásmido p15A, que es compatible con plásmidos que contienen replicones derivados de colE1;

5 (iii) Promotor tac fuerte, inducible, para transcripción de gen(es) clonado(s);

(iv) Gen lacIq - da expresión constitutiva de la proteína represora lac, manteniendo el promotor tac en el estado reprimido hasta inducción por IPTG / alolactosa;

(v) Secuencia señal OmpA - da secreción periplásmica de gen(es) clonado(s); y

10 (vi) Acoplamiento de traducción de la secuencia señal OmpA a un péptido corto lacZ, dando iniciación eficaz de traducción.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de clonación que contiene un mensaje dicistrónico de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

Son muy conocidos para los profesionales métodos generales por los que se pueden construir vectores de expresión y clonación, métodos de transfección y métodos de cultivo.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo particular, que comprende cultivar una célula huésped bacteriana que ha sido transformada con un vector de expresión de la presente invención bajo condiciones adecuadas para conducir a la expresión del DNA que codifica dicha molécula de anticuerpo, y aislando dicha molécula de anticuerpo, donde el nivel de expresión de dicho anticuerpo se ha optimizado.

20 Se puede usar cualquier célula huésped bacteriana para la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo particular codificada por un mensaje dicistrónico de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se han usado preferiblemente células huésped de *E. coli*. Se pueden usar también otros sistemas microbianos.

25 La molécula de anticuerpo puede ser secretada de la célula o dirigida al periplasma mediante secuencias señal adecuadas. Alternativamente, las moléculas de anticuerpo se pueden acumular en el citoplasma de la célula. Dependiendo del anticuerpo que se esté produciendo y del procedimiento utilizado, puede ser deseable permitir que la molécula de anticuerpo se repliegue y adopte una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que la molécula de anticuerpo se repliegue son bien conocidos por los profesionales.

30 Las moléculas de anticuerpo producidas por un mensaje dicistrónico de acuerdo con la presente invención se pueden usar para producir una composición terapéutica o para diagnóstico que comprende un anticuerpo particular en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición terapéutica o para diagnóstico o puede ir acompañado por otro o más ingredientes activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo células anti-T, anticuerpos anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como las xantinas.

35 La molécula de anticuerpo particular producida por la presente invención se puede administrar en cualquier forma y cantidad apropiadas de acuerdo con la terapia en la que se usa.

40 Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o perfusión, por ejemplo por inyección rápida o por perfusión continua. Cuando el producto es para inyección o para perfusión, puede tomar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes.

Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

45 Si la molécula de anticuerpo es adecuada para administración oral, por ejemplo en el caso de fragmentos de anticuerpo, la formulación puede contener, además del ingrediente activo, aditivos adecuados usados en la formulación de composiciones administradas oralmente.

Las composiciones terapéuticas y para diagnóstico pueden estar en forma de dosificación unitaria, en cuyo caso cada dosis unitaria comprende una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo particular. La dosis también será seleccionada de acuerdo con la edad y el estado del paciente.

50 Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, 2 a 15

días) puede ser necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se describe adicionalmente sólo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a los dibujos en los que:

La Figura 1 muestra el vector pTTQ9;

La Figura 2 muestra la secuencia de la región polienlazante OmpA;

La Figura 3 muestra el vector pACYC184;

La Figura 4 muestra el vector pTTO-1;

10 La Figura 5 muestra la secuencia de DNA completa del vector pTTO-1;

La Figura 6 muestra el vector pTTO-2;

La Figura 7 muestra el vector pDNAbEngG1;

La Figura 8 muestra el vector pTTO(TNF α);

15 La Figura 9 muestra casetes de oligonucleótidos que codifican cuatro secuencias intergénicas diferentes para la expresión de Fab' en *E. coli*;

La Figura 10 muestra acumulación periplásmica de Fab' de variantes IGS, pTTO(TNF α IGS-1), pTTO(TNF α IGS-2), pTTO(TNF α IGS-3) y pTTO(TNF α IGS-4), como resultado de análisis en matraz agitado;

La Figura 11 muestra una ligadura de cuatro formas usada para generar cuatro variantes IGS de Fab' g163;

20 La Figura 12 muestra acumulación soluble de Fab' de variantes IGS, pTTO(g163 IGS-1), pTTO(g163 IGS-2), pTTO(g163 IGS-3) y pTTO(g163 IGS-4), como resultado de análisis en matraz agitado;

La Figura 13 muestra un mapa de restricción del vector pTTOD(g163 IGS-3);

La Figura 14 muestra acumulación de Fab' soluble de variantes IGS, pTTOD(g165 IGS-1), pTTOD(g165 IGS-2) y pTTOD(g165 IGS-3), como resultado de análisis en matraz agitado;

25 La Figura 15 muestra acumulación de Fab' de variantes IGS, pTTOD(g165 IGS-1), pTTOD(g165 IGS-2), pTTOD(g165 IGS-3) y pTTOD(g165 IGS-4), como resultado de análisis comparativo en fermentadores;

La Figura 16 muestra acumulación de Fab' soluble de variantes IGS, pTTOD(gA33 IGS-2) y pTTOD(gA33 IGS-3), como resultado de análisis comparativo en fermentadores;

Ejemplos

Un mensaje dicistrónico que codifica un anticuerpo anti-TNF α

30 Se usó un mensaje dicistrónico de la presente invención para conseguir alto nivel de expresión de fragmentos Fab' anti-TNF α . El cistrón anterior codificó la cadena ligera del anticuerpo, mientras que el cistrón posterior codificó la cadena pesada del anticuerpo. Una secuencia de DNA que codifica el péptido señal OmpA se fusionó al extremo 5' del DNA que codifica para cada cadena ligera y cadena pesada para permitir secreción eficaz al periplasma.

35 Una serie de casetes de oligonucleótidos que codifican para una serie de diferentes IGSs se usó en el mensaje dicistrónico con el fin de variar el nivel de expresión de la cadena pesada. El uso de diferentes casetes alteró la velocidad de iniciación de traducción de la cadena pesada, dando por resultado una serie de velocidades de acumulación del producto de cadena pesada traducida.

40 Se diseñó una serie de cuatro IGS2, permitiendo la determinación experimental de la secuencia óptima. La variante IGS que dio lugar a la acumulación de la mayor cantidad de Fab' soluble se seleccionó experimentalmente usando expresión en matraz agitado como una guía o expresión en fermentadores como un medio definitivo. Sorprendentemente, se seleccionaron diferentes IGSs para diferentes Fab's, lo que indica que se requerirá selección empírica para cada nuevo fragmento Fab' a expresar.

Experimental

Materiales y Métodos

45 Microbiología general y técnicas de manipulación de DNA.

Se usó cepa INVαF' de *E. coli* (Invitrogen, De Schelp, Netherlands) para transformación y desarrollo de cultivo rutinario; se usó cepa W3110 de *E. coli* (ATCC # 27325) para estudios de expresión. Las enzimas de restricción y modificación de DNA se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Lewes, East Sussex, UK) y New England Biolabs (Hitchin, Herts, UK). Las preparaciones de plásmidos se realizaron usando estuches de purificación de plásmidos (QIAGEN, Crawley, West Sussex, UK). La purificación de fragmentos de DNA se realizó usando columnas de centrifugación QIAGEN. Los fragmentos de DNA se purificaron en agarosa usando el protocolo GeneClean (BIO 101). Los oligonucleótidos fueron suministrados por Oswel Oligonucleotide Service y se sintetizaron a escala 40 nM. Se realizó PCR usando 'Amplitaq' Perkin Elmer como se recomienda. Las reacciones de secuenciación de DNA se realizaron usando el estuche de terminación de cadena ABI Prism Dye-Deoxy y se dirigieron en un secuenciador automático ABI 373A (PE Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK). Los datos se analizaron usando el programa AutoAssembler (PE Applied Biosystems).

Inducción en matraz agitado

Se desarrollaron cultivos de *E. coli* W3110 en medio de cultivo L-Broth complementados con tetraciclina (7,5 µg/ml). Para inducciones se diluyeron cultivos de una noche de nueva aportación (desarrollados a 30°C) a OD₆₀₀ = 0.1 en 200 ml de medio de cultivo L-Broth en un matraz de 2 L con deflectores y se desarrollaron a 30°C en un incubador orbital. A OD₆₀₀ = 0.5, se añadió IPTG a 200 µM. Se tomaron periódicamente muestras (normalizadas para la OD).

Extracción Periplásmica

Se enfriaron en hielo muestras de cultivo (5 minutos), después las células se recogieron por centrifugación. A continuación resuspensión en tampón de extracción (Tris.HCl 100 mM, EDTA 10 mM pH7.4); las muestras se incubaron durante una noche a 30°C, después se clarificaron por centrifugación.

Prueba de Ensamble

Las concentraciones de Fab' se determinaron por ELISA. Se revistieron placas a 4°C durante una noche con Fd 6045 anti-humano (2 µg/ml en tampón de revestimiento, disolución salina fisiológica, 100 µl por pocillo) (ver el documento EP 491031). Después de lavar, se cargaron 100 µl de muestra por pocillo; se usó como un patrón Fab' gamma-1 A5B7 purificado (ver el documento EP 491031), inicialmente a 2 µg/ml. Las muestras se diluyeron en serie al doble a través de la placa en tampón conjugado de muestra (por litro: 6,05 g de tris-aminometano; 2,92 g de NaCl; 0,1 ml de Tween-20; 1 ml de caseína (0,2%)); las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Las placas se lavaron y secaron, después se añadieron 100 µl de C-kappa (GD12)-peroxidasa anti-humana (diluida en tampón conjugado de muestra). Se realizó incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Las placas se lavaron y secaron, después se añadieron 100 µl de disolución de sustrato (10 ml de disolución de acetato sódico/citrato sódico (0,1 M, pH 6)); 100 µl de disolución de H₂O₂; 100 µl de disolución de tetrametilbencidina (10mg/ml en dimetilsulfóxido)). Se leyó la absorbancia a 630 nm 4-6 minutos después de la adición de sustrato.

Fermentación

Se desarrollaron cultivos de *E. coli* W3110 en matraces agitados en medio de cultivo L-Broth complementado con tetraciclina (7,5 µg/ml) a 30°C a OD₆₀₀ = 1,0; se usaron 100 ml de este cultivo para inocular 1 L de medios SM6 (más glicerol) (Patente Europea 651803) dentro de un fermentador de 1,5 L de cultivo semicontinuo. El pH se controló a 7,0 con NH₄OH al 50% y H₂SO₄ al 5%. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo al 30% por agitación variable. No se incluyó tetraciclina en el medio fermentador. La concentración inicial de glicerol fue 3% peso/volumen; se añadió glicerol en una ocasión más durante la fermentación, de manera que dejaba de estar disponible una vez que el cultivo alcanzaba una OD₆₀₀ ~ 60. Los cultivos se desarrollaron a 30°C a OD₆₀₀ = 55, después se añadieron 120 ml de lactosa al 50%; después de la utilización de glucosa disponible viene la inducción por lactosa. Se añadió un lote de 60 ml más de lactosa 20 horas después. La fermentación se monitorizó durante 25 a 30 horas después de la inducción y periódicamente se tomaron muestras (normalizadas para la OD).

Resultados

Construcción de plásmidos pTTO-1 y pTTO-2

El plásmido pTTQ9 se obtuvo de Amersham y se muestra en la Figura 1. Se digirió una alícuota (2 µg) con las enzimas de restricción Sall y EcoRI, el producto digerido se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% y el fragmento de DNA grande (4520 pb) se purificó. Se sintetizaron dos oligonucleótidos que, cuando se hibridan entre sí, codifican la región polienlazante OmpA mostrada en la Figura 2. Esta secuencia tiene extremos cohesivos que son compatibles con los extremos Sall y EcoRI generados mediante la restricción de pTTQ9. Clonando esta "casete" de oligonucleótidos en el vector pTTQ9, no se regenera el sitio Sall, pero se mantiene el sitio EcoRI. La casete codifica los primeros 13 aminoácidos de la secuencia señal de la proteína Omp-A de la membrana externa de *E. coli*, precedida por el sitio de unión al ribosoma de Shine Dalgarno del gen OmpA. Además se encuentran presentes los sitios de restricción para las enzimas XbaI, MunI, Styl y SplI. Los sitios MunI y Styl están en la región codificante de la secuencia señal OmpA y están previstos como los sitios de clonación 5' para la inserción de los genes. Los dos oligonucleótidos que componen esta casete fueron hibridados conjuntamente mezclando a una concentración de 5

pmoles/ μ l, calentando en un baño de agua a 95°C durante 3 minutos, enfriando después lentamente a la temperatura ambiente. La secuencia hibridada se ligó después en pTTQ9 cortado con Sall/EcoRI. El intermedio plasmídico resultante, denominado pTQomp, fue verificado mediante secuenciación de DNA.

5 Alícuotas de este producto intermedio se escindieron después con SspI y EcoRI (fragmento de 2350 pb purificado) y con EcoRI y XmnI (fragmento de 350 pb purificado). El fragmento de 2350 pb codifica la región terminadora de la transcripción y el gen *lacIq* y el fragmento de 350 pb codifica el promotor *tac*, la secuencia señal *OmpA* y el sitio de clonación múltiple. El plásmido pACYC184 (New England Biolabs - Figura 3) se digirió con StylI, se trató con Nucleasa de Frijol Mungo (nucleasa S1 de *Aspergillus*) para generar extremos romos, después se digirió con PvuII (fragmento de 2348 pb purificado - este fragmento codifica el marcador de resistencia a tetraciclinas y el origen p15A de replicación). Este fragmento se trató con fosfatasa alcalina para separar fosfatos terminales 5' (para evitar autoligadura) y se ligó a otros fragmentos purificados. El plásmido resultante se llamó pTTO-1 y se muestra en el mapa de la Figura 4. La Figura 5 muestra la secuencia de DNA completa de pTTO-1. La inserción del dominio constante kappa de cadena ligera de Ig humana, como un fragmento SphI-EcoRI del plásmido pH132, generó pTTO-2 (Figura 6).

15 Inserción de regiones variables de Fab' en pTTO-2

Los genes de regiones variables de Fab' TNF α se generaron por amplificación PCR a partir de vectores para expresión en células de mamíferos de anticuerpos íntegros que contienen la secuencia de SEQ ID8 del PCT/GB01/02477. El DNA que codifica la secuencia señal *OmpA* y que incluye el sitio enzimático de restricción MnlI para clonar en pTTO-2 sin cambio de marco de lectura, se unió al extremo 5' de cada gen de manera que reemplazó la Ig nativa líder.

El gen V_L purificado (MnlI/SplI) se insertó después en el sitio MnlI / SplI de pTTO-2 para generar el pTTO(TNF α L) intermedio de cadenas ligeras. .

El gen V_H de cadenas pesadas fue clonado por medio del vector intermedio pDNAbEng-G1 (figura 7), entre los sitios MnlI-ApaI, generando pDNAbEng(TNF α H). La clonación del gen de cadenas pesadas a partir de este plásmido como un fragmento EcoRI en el sitio EcoRI de pTTO(TNF α L) generó el plásmido de expresión en *E. coli* pTTO(TNF α) (Figura 8).

25 Construcción de variantes IGS de pTTO(TNF α)

Se construyó una serie de cuatro variantes de secuencia intergénica (Figure 9), permitiendo la determinación empírica de la IGS óptima para Fab' de TNF α . IGS1 y IGS2 tienen secuencias intergénicas muy cortas (-1 y +1 respectivamente) y se podría esperar que causen traducción fuertemente acoplada; las secuencias SD (subrayadas) son ligeramente diferentes. Estas dos secuencias conferirán muy probablemente un alto nivel de iniciación de traducción. IGS3 e IGS4 tienen una distancia mayor entre codones de terminación y de iniciación (+13) y difieren en su composición de secuencia. La secuencia SD de IGS3 es más fuerte que la de IGS1, 2 ó 4. Todas las secuencias se estudiaron en cuanto a estructura secundaria (usando el programa mfold (Jaeger, J.A. et al. Methods Enzymology, 183: 281-306 (1990); parte del Paquete GCG Wisconsin, Accelrys)) y se "optimizaron" lo más posible; sin embargo, con fuerte acoplamiento de traducción de las dos cadenas, la falta de disociación ribosómica significa que el mRNA puede no estar "desnudo", evitando formación de estructura secundaria.

Las variantes IGS se construyeron por ligadura de dos fragmentos en un vector preparado por digestión SacI - NotI de pTTO(TNF α). Un fragmento de inserción preparado por digestión MnlI-NotI de pDNAbEng(TNF α) se purificó y ligó junto con cada casete de IGS (SacI-MnlI) en el vector, generando los 4 plásmidos de expresión pTTO(TNF α IGS-1), pTTO(TNF α IGS-2), pTTO(TNF α IGS-3) y pTTO(TNF α IGS-4).

40 Análisis de expresión en matraz agitado de variantes IGS de TNF α

Los cuatro vectores de variantes IGS y el vector de expresión original pTTO(TNF α) se usaron para transformar la cepa W3110 de *E. coli*. Las células transformadas de *E. coli* se analizaron después para la expresión de Fab' en matraces agitados como se ha descrito. Los resultados de un experimento típico se muestran en la Figura 10.

Las diferentes secuencias intergénicas confirieron diferentes perfiles de expresión. IGS1 e IGS2 acumularon Fab' periplásmico rápidamente con un pico a 1 hora después de la inducción, tras el cual cayó el nivel recuperado. El pico fue mayor y la caída más brusca para la IGS1. Estos resultados fueron consistentes con un alto nivel de síntesis, como se esperaba para el estrecho acoplamiento de traducción para estas construcciones. La IGS1 confería aparentemente un mayor nivel de expresión de cadenas pesadas que la IGS2. En este caso resultó que este alto nivel de expresión fue mal tolerado, puesto que los niveles de expresión periplásmica cayeron tras el pico de 1 hora. Esto se observó en el perfil de desarrollo del cultivo de IGS1 (no mostrado), que alcanzó su punto máximo a 1 hora después de la inducción, sugiriendo muerte y lisis celulares.

La IGS3 acumuló Fab' más lentamente, pero alcanzó su punto máximo a las 2 horas después de la inducción con un valor más alto de pico (325 ng/ml/OD), antes de que los niveles disminuyeron. El desarrollo de este cultivo continuó

a las 3 horas después de la inducción y alcanzó un pico más alto de biomasa (no mostrado). Esto es consistente con un nivel inferior de síntesis de cadenas pesadas.

La IGS4 acumuló material a una velocidad aún menor y no alcanzó el pico alto de productividad de las otras tres construcciones.

- 5 Todas las variantes IGS superaron significativamente al vector original pTTO(TNF α). La hipótesis de que diferentes secuencias IGS confieren diferentes velocidades de iniciación de traducción está apoyada por estos resultados experimentales. Parece que para el Fab' de TNF α es mal tolerada una mayor velocidad de iniciación de traducción de cadenas pesadas y por tanto no es óptima. Una velocidad inferior, como la conferida por la IGS3, da por resultado mejores características de desarrollo de cultivo y en consecuencia un rendimiento mejor se acumula a lo largo del tiempo.

10 Tras la comparación de productividad en el fermentador (no mostrado), la construcción IGS3 se seleccionó como la de rendimiento más alto.

Un mensaje dicistrónico que codifica un anticuerpo Fab' diferente: creación de variantes IGS de Fab' g163

- 15 El juego de vectores pTTO/IGS descrito anteriormente se usó después para análisis de expresión de más Fab's. Inicialmente se usó Fab' humanizado. Se usó una ligadura de 4 formas para generar las 4 variantes IGS de Fab' g163 (Figura 11). Una cadena pesada intermedia se generó por inserción de un fragmento MunI - Apal del gen g163 V_H (obtenido mediante recuperación por PCR del vector de expresión en mamíferos pGamma-4) en el plásmido pDNAEngG1. Este producto intermedio se escindió con PvuII y NotI para generar un fragmento de g163 V_H + C_H1. El plásmido pTTO(TNF α) se escindió con MunI y NotI y el fragmento grande se purificó para dar un fragmento vector. Se generó un fragmento MunI - SphI V_L mediante recuperación por PCR a partir del vector de expresión pMR10.1(g163) en mamíferos. Finalmente se generaron fragmentos C_K-IGS por digestión SphI - PvuII de las 4 variantes IGS de 4 pTTO(TNF α) descritas anteriormente. Cuatro ligaduras separadas generaron después las construcciones pTTO(g163 IGS-1), pTTO(g163 IGS-2), pTTO(g163 IGS-3) y pTTO(g163 IGS-4). Los resultados del análisis en matraz agitado de estas construcciones se muestran en la Figura 12.

- 25 El perfil de expresión fue bastante similar al observado con Fab' TNF α , en que IGS-1 y -2 dieron por resultado acumulación de Fab' muy rápida, alcanzando su punto máximo 1 hora después de la inducción antes de reducirse bruscamente. La IGS-3 dio por resultado una velocidad inicial de acumulación más lenta, alcanza su punto máximo en un tiempo después (2-3 horas después de la inducción) antes de reducirse a una velocidad más lenta. La construcción IGS-4 aumentó lentamente a lo largo del tiempo de inducción y de nuevo nunca alcanzó los altos rendimientos de las otras construcciones. Debido a los perfiles de expresión y a los perfiles de desarrollo de cultivo que muestran que, para la IGS-1 y -2, la biomasa alcanzó también su pico máximo solo 1 hora después de la inducción (no mostrado), la IGS-3 se eligió y expresó en el fermentador a rendimientos altos (no mostrado).

Construcción del plásmido pTTOD

- 35 Con el fin de simplificar las estrategias de codificación de Fab', el plásmido pTTOD se obtuvo a partir de plásmido pTTO-1 por separación de sitios de restricción de la cadena principal para PvuII (3 sitios), EcoRV (2 sitios) and Apal (1 sitio). Al realizar estos cambios no se alteraron las secuencias del gen lacIq codificantes de la proteína ni el gen de resistencia a la tetraciclina, aunque se realizaron cambios "silenciosos" a nivel del DNA. Se utilizó una estrategia de PCR, en la cual se diseñaron cebadores que portaban cambios "silenciosos" que eliminaban estos sitios de restricción y se utilizaron para amplificar las secciones del plásmido parental (pTTO-1). Después se utilizaron sitios de restricción colindantes (no alterados) para reemplazar las secuencias del plásmido parental por estas secuencias modificadas. El plásmido pTTOD se creó por este procedimiento multietapa. Se logró la transferencia de los genes g163 Fab' existentes en el vector pTTO a pTTOD utilizando los sitios PstI y EcoRI únicos que flanquean los genes, creando variantes IGS 1-4 de pTTOD(g163). La Figura 13 muestra el mapa de restricción de pTTOD(g163 IGS-3).

Expresión de otros Fab's como variantes IGS

- 45 Además de los Fab's TNF α y g163, se han expresado otros Fab's más como dos o más variantes IGS. Estos incluyen Fab's llamados g165 y gA33. La Figura 14 muestra pTTOD(g165) IGS-1 a -3 comparadas en el matraz agitado. A diferencia del de TNF α y g163, el de IGS-2 y IGS-1 superan al de IGS-3. La expresión de este Fab' parece ser bien tolerada por la célula huésped incluso a una velocidad rápida, y el cultivo que expresa IGS-2 continuó desarrollándose a través del periodo de inducción (no mostrado). La Figura 15 muestra una comparación de fermentadores de IGS-1 a -4 con este Fab', y esto reproduce esencialmente la observación hecha en el matraz agitado. IGS-2 se confirmó como la variante de rendimiento más alto. Con el Fab' gA33 se compararon pTTOD(gA33) IGS-2 y-3 en el fermentador y ambos dieron rendimientos similares (Figura 16). Por tanto, con diferentes Fab's se requieren diferentes secuencias IGS para rendimiento óptimo.

Análisis en matraz agitado frente a fermentador

- 55 En el matraz agitado, la desrepresión del promotor se consigue con IPTG que da inducción muy rápida de expresión. El régimen de inducción en el fermentador es diferente y más suave usando lactosa (que se convierte por la bacteria

en alolactosa) para activar el promotor. A pesar de estas diferentes cinéticas de inducción, se ha demostrado que el matraz agitado da una indicación de cómo se compararán en el fermentador las construcciones (ver Figuras 14 y 15).

5 Se demuestra claramente el principio de que diferentes Fab's requieren una IGS diferente para rendimiento óptimo. La novedad del sistema descrito en el presente documento está en el uso de casetes de IGSs para lograr velocidades de iniciación de traducción óptimas del segundo gen de un mensaje dicistrónico como un medio de conseguir expresión de Fab' con alto nivel. En el sistema descrito, la expresión de cadenas ligeras permanece inalterada y solamente se optimiza la velocidad de iniciación de traducción de cadenas pesadas. Hay dos posibles explicaciones por las cuales esta estrategia tiene éxito:

10 (i) La expresión de la cadena ligera es de poca consecuencia para el nivel global de acumulación de Fab', siempre que se sintetice suficiente cadena ligera para evitar que la cadena pesada llegue a estar en exceso. El exceso de cadena ligera se tolera normalmente sin problema, y es el nivel de traducción de la cadena pesada el que dicta la eficacia de expresión soluble; o

15 (ii) La optimización de cadena pesada en efecto se afina para la velocidad fija de expresión de cadena ligera, de manera que los niveles de las dos cadenas están equilibrados. No es la velocidad de plegamiento/secreción de la cadena pesada per se la que dicta la eficacia de la expresión soluble, sino el equilibrio de expresión de las dos cadenas heterólogas.

Se debe entender que los ejemplos descritos antes son meramente ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mensaje dicistrónico para producir una molécula de anticuerpo con una particular especificidad de unión al antígeno, en el que el cistrón anterior contiene DNA que codifica para la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón posterior contiene DNA que codifica para la correspondiente cadena ligera o cadena pesada respectivamente, caracterizado porque los dos cistrones están unidos por una secuencia intergénica optimizada (IGS) donde la IGS es IGS 1 (SEQ ID NO:4), IGS2 (SEQ ID NO:7), IGS3 (SEQ ID NO:10) o IGS4 (SEQ ID NO:13), y donde el anticuerpo producido no es un anticuerpo anti-TNF α o un anticuerpo anti-KDR.
2. Un vector de expresión que contiene un mensaje dicistrónico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2 donde el vector de expresión es pTT0-1 (SEQ ID NO:3).
4. Una célula huésped microbiana que se ha transformado con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2 ó la reivindicación 3.
5. Una célula huésped microbiana de acuerdo con la reivindicación 4, donde la célula huésped es *E.coli*.
- 15 6. Un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 ó la reivindicación 5.
7. Una molécula de anticuerpo producida por el procedimiento de la reivindicación 6.

Fig. 1

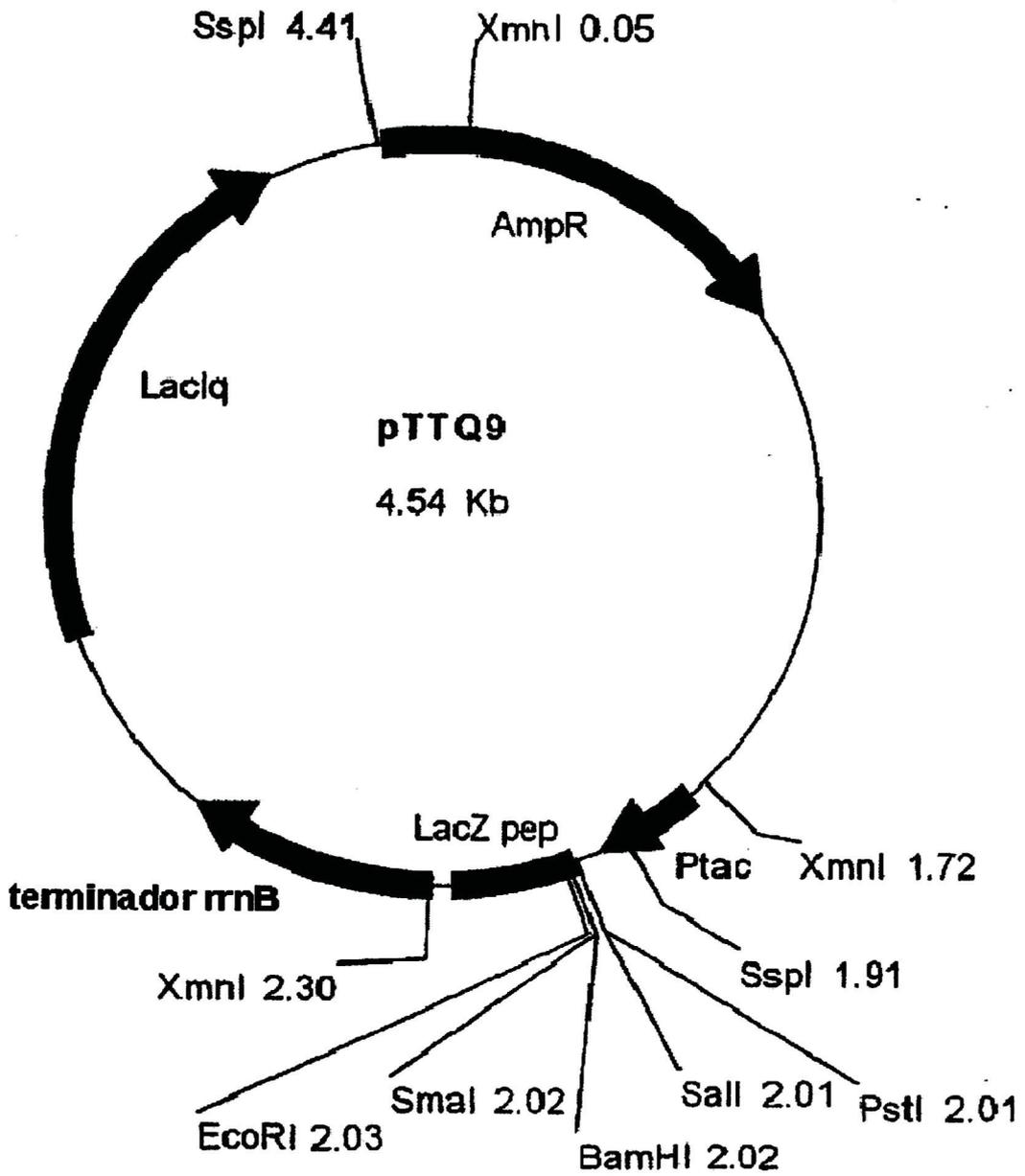
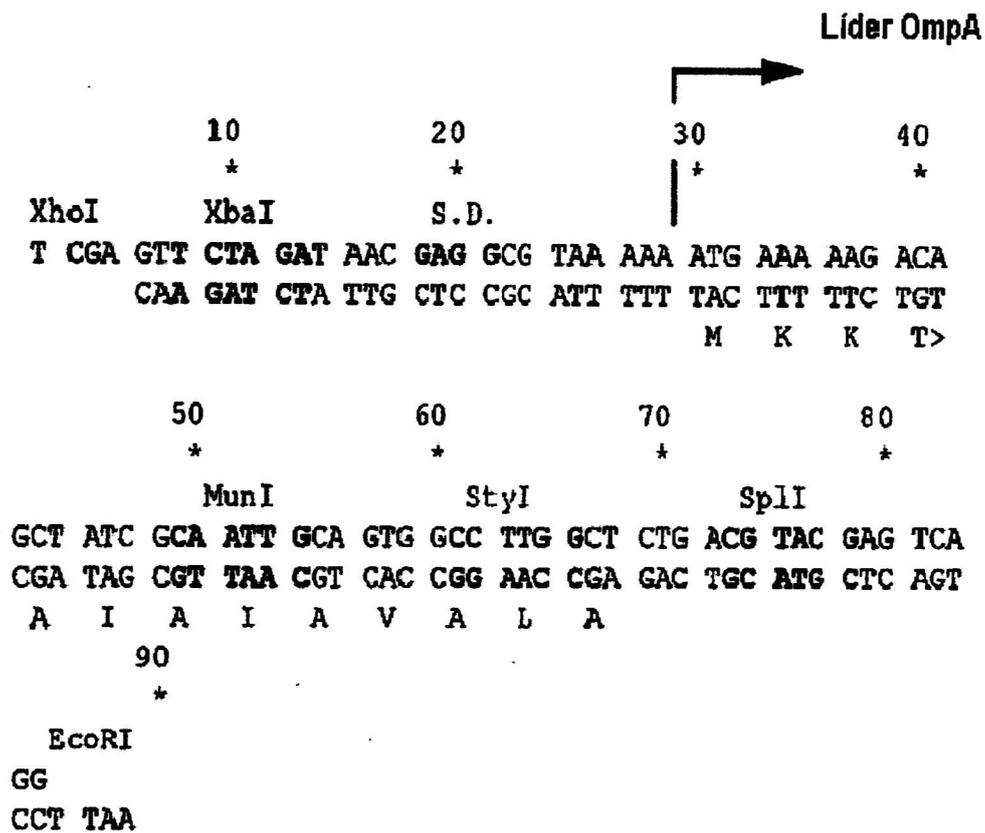


Fig. 2

Secuencia del Adaptador Oligonucleotídico OmpA



Los sitios de restricción internos se muestran en **negrita**
 El extremo cohesivo 5' XhoI se enlaza al sitio vector Sall, bloqueándolo
 S.D. representa la secuencia Shine Dalgarno de OmpA

Fig. 3

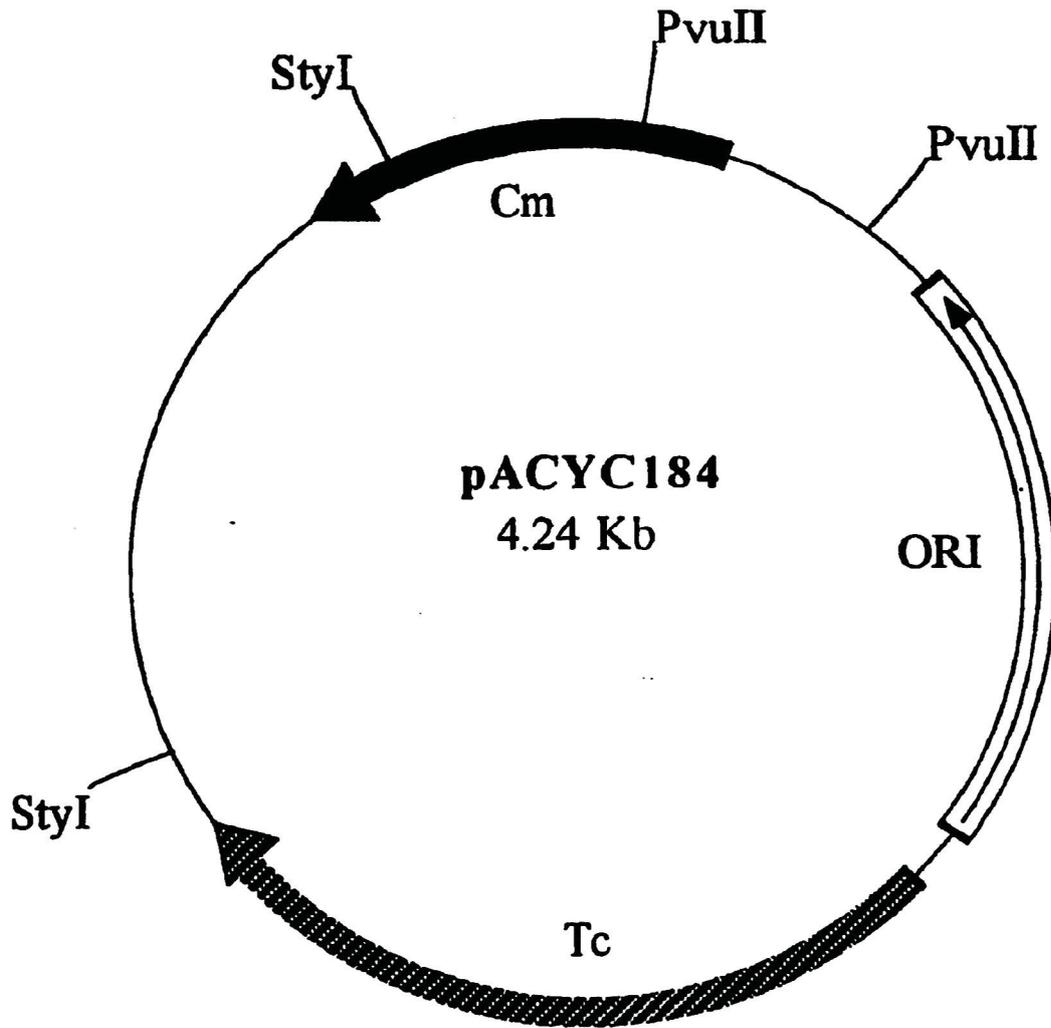


Fig. 4

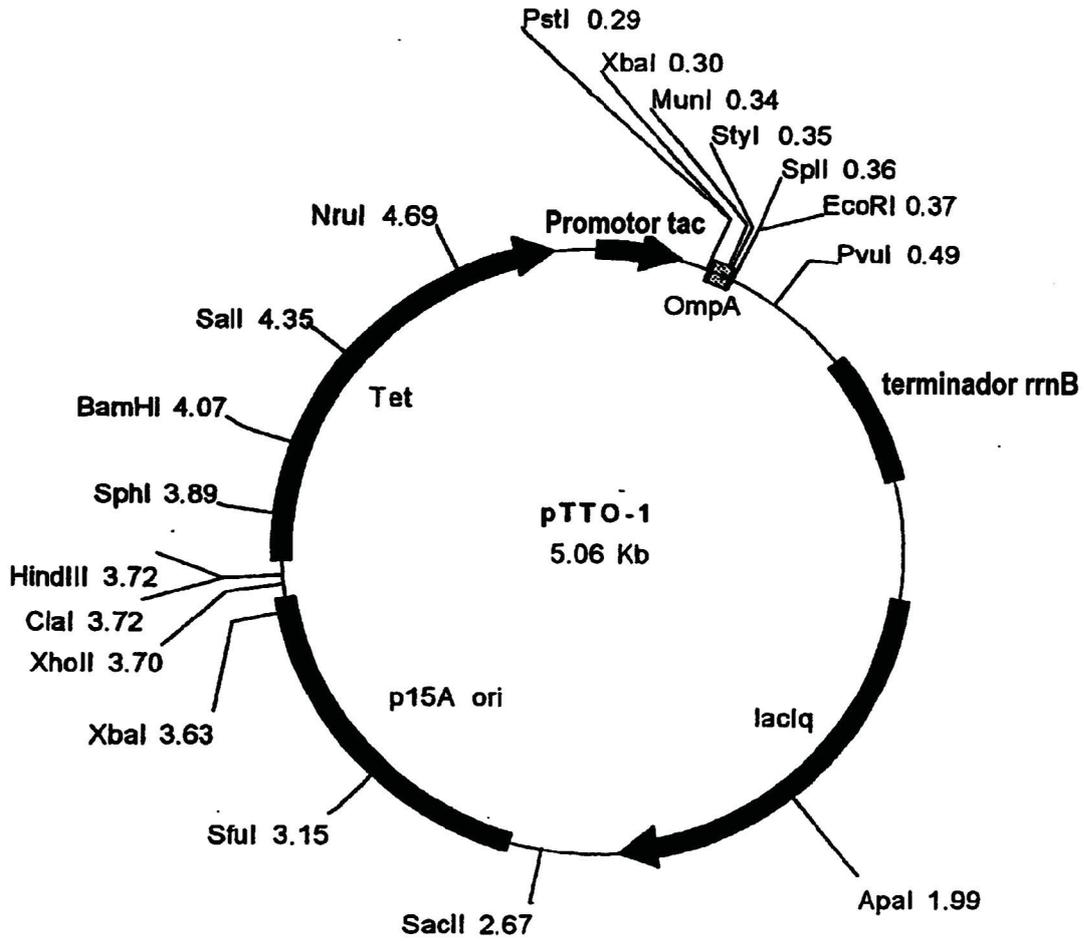


FIG. 5

Secuencia nucleotídica de p-TTO-1

```

10      20      30      40      50      60      70
AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT CTGGCGTCAG GCAGCCATCG
TTAAGAGTAC AAACGTGCGA ATAGTAGCTG ACGTGCCACG TGGTTACGAA GACCGCAGTC CGTCGGTAGC

80      90      100     110     120     130     140
GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCGTT
CTTCGACACC ATACCGACAC GTCCASCATT TAGTGACGTA TTAAGCACAG CGAGTTCGGC GTGAGGGCAA

150     160     170     180     190     200     210
CTGGATAATG TTTTTTGCGC CGACATCATA ACGGTTCTGG CAAATATTCT GAAATGAGCT GTTGACAATT
GACCTATTAC AAAAAACGCG GCTGTAGTAT TGCCAAGACC GTTTATAAGA CTTTACTCGA CRACTGTAA

220     230     240     250     260     270     280
AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCGATGAGCT
TTAGTAGCCG AGCATATTAC ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTTAAAGTG TGTCCTTTGT CGCTACTCGA

290     300     310     320     330     340     350
TGGTGCAGG TCGAGTTCTA GATAACGAGG CGTAAAAAAT GAAAAAGACA GCTATCGCAA TTGCAGTGGC
ACCGACGTCC AGCTCAAGAT CTATTGCTCC GCATTTTTTA CTTTTTCTGT CGATAGCGTT AACGTACCOS

360     370     380     390     400     410     420
CTTGGCTCTG ACGTACGAGT CAGGAATTCA CTGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCCTG
GAACCGAGAC TGCATGCTCA GTCCTTAAGT GACCGGCAGC AAAATGTTGC AGCACTGACC CTTTTGGGAC

430     440     450     460     470     480     490
GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC ATCCCOCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG
CGCAATGGGT TGAATTAGCG GAAOCTCGTG TAGGGGGAAA GCGGTGCGAC GCATTATCGC TTCTCCGGCC

500     510     520     530     540     550     560
CAOCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG OCTGAATGGC GAATGGCGCC TGATGCGGTA TTTTCTCCIT
GTGGCTAGCG GGAAGGGTTG TCACCGCGTC GGACTTACCG CTTACCGCGG ACTACGCCAT AAAAGAGGAA

570     580     590     600     610     620     630
ACGCATCTGT GCGGTATTTT ACACCGCATA AATCCCTGT TTTGGCGGAT GAGAGAAGAT TTTCAGCTCG
TGCCTAGACA CGCCATAAAG TGTGGCGTAT TTAAGGGACA AAACCGCCTA CTCTCTTCTA AAAGTCCGGAC

640     650     660     670     680     690     700
ATACAGATTA AATCAGAAGC CAGAAGCGGT CTGATAAAAC AGAATTTGCC TGGCGGCAGT AGCGCGGTGG
TATGTCTAAT TTAGTCTTTC GTCTTCGCCA GACTATTTTG TCTTAAACGG ACCGCCGTCA TCGCGCCACC

710     720     730     740     750     760     770
TCCACCTGA CCCCATGCCG AACTCAGAAG TGAACGCGCG TAGCGCCGAT GGTAGTGTGG GGTCTCCCCA
AGGGTGGACT GGGGTACGGC TTGAGTCTTC ACTTTGCGGC ATCGCGGCTA CCATCACACC CCAGAGGGGT

780     790     800     810     820     830     840
TGCGAGAGTA GGGAACTGCC AGGCATCAAA TAAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT
ACGCTCTCAT CCCTTGACGG TCCGTAGTTT ATTTTGTCTT CCGAGTCAGC TTTCTGACCC GGAAGSCAAA

850     860     870     880     890     900     910
TATCTGTTGT TTGTGGTGA ACGCTCTOCT GAGTAGGACA AATCOGCCGG GAGCGGATTT GAACGTTGCG
ATAGACAACA AACAGCCACT TGCAGAGGGA CTCATCTCTG TTAGGGCGCC CTCGCCTAAA CTTGCAACGC

920     930     940     950     960     970     980
AAGCAACGGC COGGAGGGTG GCGGGCAGGA CGCCCGCCAT AAAC TGCCAG GCATCAAAT AAGCAGAAGG
TTCGTTGCCG GGCCTCCAC CGCCCGTCTT GCGGGCGGTA TTTGACGGTC CGTAGTTTAA TTCGCTTCC

990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
CCATCCTGAC GGTAGGACTG GGTAGGCTT TTTGCGTTTC TACAACCTCT TCCTGTCGTC ATATCTACAA GCCATCCCC
GGTAGGACTG CCTACCGGAA AAACGCAAAG ATGTTTGAGA AGGACAGCAG TATAGATGTT CCGTAGGGGG

1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
CACAGATACG GTAAACTAGC CTCGTTTTTG CATCAGGAAA GCAGGGAAAT TATGGTGCAC TCTCAGTACA
GTGTCTATGC CATTTGATCG GAGCAAAAAC GTAGTCTTTT CGTCCCTTAA ATACCACGTC AGAGTCAATG

1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
ATCTGCTCTG ATGCCGCATA GTTAAGCCAG CCCGACACCC CGCCAACACC CGCTGACGCG CCCTGACGGG
TAGACGAGAC TACGGCGTAT CAATTCGGTC GGGGCTGTGG GCGGTTGTGG GCGACTGCGC GGGACTGCC

1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
CTTGTCTGCT CCGGGCATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT
GAACAGACGA GGGCCGTAGG CGAATGTCTG TTCGACACTG GCAGAGGCCC TCGACGTACA CAGTCTCCAA

1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330
TTCACCGTCA TCACCGAACC GCGCGAGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC TATTTTTATA GGTAAATGTC
AAGTGGCAGT AGTGGCTTTG CGGCTCTGTC TTTCCCGSAG CACTATGCGG ATAAAAATAT CCAATTACAG

1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400

```

FIG. 5 (cont.)

ATGATAATAA TGTTTTCTTA GACGTGAGGT TCTGTACCG ACACCATCGA ATGGTGCAA ACCTTTCGG
 TACTATTATT ACCAAAGAAT CTGCACTCCA AGACATGGGC TGTGGTAGCT TACCAGTTT TGGAAAGCCG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GTATGGCATG ATAGCGCCCG GAGAGAGTC AATTCAGGT GGTGAATGTG AAACCCAGTAA CGTTATACGA
 CATACCGTAC TATCGCGGGC CTTCTCTCAG TTAAGTCCCA CCACTTAGAC TTTGGTCATT GCAATATGCT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTGCGAGAG TATGCCCCTG TCTCTTATCA GACCGTTCC CGCGTGGTGA ACCAGGCCAG CCACGTTCT
 ACAGCGTCTC ATACGGCCAC AGAGAATAGT CTGGCAAAGG GCGCACCCT TGGTCCGGTC GGTGCAAAGA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 GCGAAAACGC GGGAAAAGT GGAAGCGGCG ATGGCGGAGC TGAATTACAT TCCCAACCCG GTGGCAGAAC
 CGCTTTTGGC CCCTTTTCA CCTTCGCCG TACCOCCTCG ACTTAATGTA AGGGTTGGCG CACCGTGTG
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AACTGGCCGG CAAACAGTCG TTGCTGATTG GCGTTGCCAC CTCCAGTCTG GCCCTGCAG CGCCGTCGA
 TTGACCGCCC GTTTGTGAGC AACGACTAAC CGCAACGGTG GAGGTGAGAC CGGGACGTGC GCGGCAGCGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 AATTGTCCGG GCGATTAAAT CTCGCGCCGA TCAACTGGGT GCCAGCGTGG TGGTGTGAT GGTAGAACGA
 TTACAGCGC CGCTAAATTA GAGCGCGGCT AGTTGACCCA CCGTCCGACC ACCACAGCTA CCATCTTGT
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 AGCGGCGTCG AAGCCTGTAA AGCGGCGGTC CACAATCTTC TCGCGCAACG CGTCAGTGGG CTGATCATA
 TCGCCGCASC TTGGGACATT TCGCCGCCAC GTGTTAGAAG AGCGCGTTGC GCAGTCACCC GACTAGTAA
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTATCCGCT GGATGACCAG GATGCCATTG CTGTGGAAGC TGCCTGCACT AATGTTCCGG CGTTATTTCT
 TGATAGGCGA CCTACTGGTC CTACGGTAAC GACACCTTCG ACGGACGTGA TTACAAGGCC GCAATAAAGA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 TGATGTCTCT GACCAGACAC CCATCAACAG TATTATTTTC TCCCATGAAG ACGGTACGCG ACTGGGCGT
 ACTACAGAGA CTGGTCTGTG GGTAGTTGTC ATAATAAAG AGGGTACTTC TGCCATGCGC TGACCCGCAC
 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
 GAGCATCTGG TCGCATTGGG TCACCAGCAA ATCGCGCTGT TAGCGGGCCC ATTAAGTCT GTCTCGGCGC
 CTCGTAGACC AGCGTAACCC AGTGGTCGTT TAGCGCBACA ATCGCCCGG TAATTCAAGA CAGAGCCGCG
 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GTCTGCGTCT GGCTGGCTGG CATAAATATC TCACTCGCAA TCAAATTCAG CCGATAGCGG AACGGGAAGG
 CAGACGCGA COGACCGACC GTATTTATAG AGTGAGCGTT AGTTAAAGTC GGCTATCGCC TTGCCCTTCC
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
 CGACTGGAGT GCCATGTCCG GTTTTCAACA AACCATGCAA ATGCTGAATG AAGGCATCGT TCCACTGCG
 GCTGACCTCA CGGTACAGGC CAAAAGTTGT TTGGTACGTT TACGACTTAC TCCCGTAGCA AAGGTGACGC
 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
 ATGCTGTTTG CCAACGATCA GATGGCGCTG GCGCAATGC GCGCCATTAC CGAGTCCGGG CTGCGGCTG
 TAGACCAAC GTTTGCTAGT CTACCCGAC CCGCGTTACG CCGGGTAATG GCTCAGGCC GACGCGCAAC
 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310
 GTGCGGATAT CTCGGTAGTG GGATACGAG ATACCGAAGA CAGCTCATGT TATATCCCG CGTTAACAC
 CACGCTATA GAGCCATCAC CCTATGCTGC TATGGCTCT GTCGAGTACA ATATAGGGCG GCAATTGGTG
 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380
 CATCAAACAG GATTTTCCG TGCTGGGGCA AACAGCGTG GACCGCTTGC TGCAACTCTC TCAGGGCCAG
 GTAGTTTGT CTAAAAGCG ACGACCCCGT TTGGTCCAC CTGGCGAAG ACCTTGAGAG AGTCCCGTTC
 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450
 GCGGTGAAGG GCAATCAGCT GTTGCCCGTC TCACTGATGA AAAGAAAAC CACCCTGGCG CCCAATACG
 CGCCACTTCC CGTTAGTCGA CAACGGGCAG AGTGACCCT TTTCTTTTTC GTGGGACCG GGGTTATGCG
 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 AAACCGCCTC TCCCGCGCG TTGGCCGATT CATTAAATGCA GCTGGCAGCA CAGGTTTCCC GACTGGAAG
 TTTGGCGGAG AGGGGCGCG AACCGGCTAA GTAATTACGT CGACCGTGT GTCCAAAGGG CTGACCTTTC
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
 CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTAA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTAT
 GCCGTCCTACT CGCGTTGCGT TAATTACATT CAATCGAGTG AGTAATCCGT GGGTCCGAA ATGTGAATA
 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660
 GCTTCCGACC TGCAAGAAC TCACGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAATG TGCGCGGAAC CCCTATTTGT
 CGAAGGCTGG ACGTTCCTGG AGTGCACTCC ACOGTGAAA GCCCCTTAC ACGGCCTTG GGGATAAACA
 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730
 TTATTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAA
 AATAAAAAGA TTTATGTAAG TTTATACATA GCGGAGTACT CTGTTATTGG GACTATTTAC GAAGTTATTA
 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 CTGTCCCTCC TGTTGAGTA CTGACGGGCT GGTGCGTAAC GGCAAAAGCA CGCCCGGACA TCAGCGCTAG

FIG. 5 (cont.)

GACAGGGAGG ACAAGTOGAT GACTGCCCCA CCACGCATTG CCGTTTTTCGT GGCGGCCTGT AGTCGCGATC
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870
 CCGAGTGTAT ACTGGCTTAC TATGTTGGCA CTGATGAGGG TGTCAGTGAA GTGCTTCATG TGGCAGGAGA
 GCCTCACATA TGACCGAATG ATACACCCGT GACTACTCCC ACAGTCACTT CACGAAGTAC ACCGTCTCT
 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 AAAAAGGCTG CACCCGGTGC TCAGCAGAAT ATGTGATACA GGATATATTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT
 TTTTCCGAC GTGGCCACGC AGTCGTCTTA TACACTATGT CCTATATAAG GCGAAGGAGC GAGTGACTGA
 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010
 CGCTACGCTC GGTCTGTCGA CTGCGGCGAG CCGAAATGGC TTACGAACGG GCGCGAGATT TCCTGGAAGA
 GCGATGCGAG CCAGCAAGCT GACGCGCTC GCCTTTACCG AATGCTTGCC CCGCCTCTAA AGGACTTCT
 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080
 TGCCAGGAG ATACTTAACA GGGAAAGTGA AGGGCCGCGG CAAAGCCGTT TTTCCATAGG CTCGCGCCCC
 ACGGTCCTTC TATGAATTGT CCCTTCACTC TCCCGGCGCC GTTTCGGCAA AAAGGTATCC GAGGCGGGGG
 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150
 CTGACAAGCA TCACGAATC TGACGCTCAA ATCAGTGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGTACCA
 GACTGTTCGT AGTGCTTTAG ACTGCGAGTT TAGTCACCAC CGCTTTGGGC TGTCCTGATA TTTCTATGGT
 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220
 GCGGTTTCCC CCTGGCGGCT CCCTCGTGGC CTCTCCTGTT CCTGCTTTC GGTTTACCGG TGTCAATCCG
 CCGCAAAGGG GGACGCGCGA GGGAGCACGC GAGAGGACAA GGACGGAAG CCAAATGGCC ACAGTAAGGC
 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290
 CTGTTATGGC CGCGTTTGTG TCATTCCAGC OCTGACACTG AGTTCGCGGT AGGCAGTTCG CTCGAGCTG
 GACAATACCG GCGCAAACAG AGTAAGGTGC GGACTGTGAG TCAAGGCCCA TCCGTCAAGC GAGGTTGCGAC
 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 GACTGTATGC ACGAACCCCC CGTTCAGTCC GACCGCTGCG CTTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
 CTGACATACG TGCTTGGGGG GCAAGTCAGG CTGGCGAGCG GGAATAGGCC ATTBATAGCA GAAGTCAAGT
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430
 ACCCGAAGG ACATGCAAAA GCACCCTGG CAGCAGCCAC TGGTAATTGA TTTAGAGGAG TTAGCTTGA
 TGGGCTTTC TGTACGTTTT CGTGGTGACC GTCGTCGGTG ACCATTAAC AAATCTCCTC AATCAGAAT
 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 AGTCATGCGC CGGTTAAGGC TAAACTGAAA GGACAAGTTT TGGTGACTGC GCTCCTCCAA GCCAGTTACC
 TCAGTAACGG GCCAATTCCG ATTTGACTTT CCTGTTCAAA ACCACTGACG CGAGGAGGTT CCGTCAATGG
 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570
 TCGGTTCAA GAGTTGGTAG CTCAGAGAAC GTTCGAAAA CCGCCTGCA AGGCGGTTTT TTCGTTTTCA
 AGCCAAAGTT CTCACCATC GAGTCTCTTG GAAGCTTTTT GCGGGACGT TCCGCCAAAA AAGCAAAGT
 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640
 GAGCAAGAGA TTACGCGCAG ACCAAAACGA TCTCAAGAAG ATCATCTTAT TAATCAGATA AATATTTCT
 CTGTTCTCT AATGCGCGTC TGGTTTTGCT AGAGTTCTTC TAGTAGAATA ATTAGTCTAT TTTATAAAG
 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710
 AGATTTCAAT GCAATTTATC TCTCAAATG TAGCACTAG AGTCAGCCCC ATACGATATA AGTTGTAAT
 TCTAAAGTCA CGTTAAATAG AGAAGTTTAC ATCGTGGACT TCAGTCGGGG TATGCTATAT TCAACATTA
 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CTCATGTTTG ACAGCTTATC ATCGATAAGC TTTAATGGGG TAGTTTATCA CAGTTAAATT GCTAACGCGA
 GAGTACAAAC TGTGGAATAG TAGCTATTCC AAATTACGCC ATCAAATAGT GTCAATTTAA CGATTGCGTC
 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850
 TCAGGCACCG TGTATGAAAT CTAACAATGC GCTCATCGTC ATCCTCGGCA CCGTACCCTT GGATGCTGTA
 AGTCCGTGGC ACATACTTTA GATTGTTACC CGAGTAGCAG TAGGAGCCGT GGCAGTGGGA CCTACGACAT
 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920
 GGCATAGGCT TGGTTATGCC GGTACTGCCG GGCCTCTTGC GGGATATCGT CCATTCCGAC AGCATCGCCA
 CCGTATCCGA ACCAATACGG CCATGAOCCG CCGGAGAACC CCCTATAGCA GGTAAAGGCTG TCGTAGCGGT
 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990
 GTCACATAGG CGTGCTGCTA GCGCTATATG CGTTGATGCA ATTTCTATGC GCACCCGTTT TCGGAGCACT
 CAGTGATACC GCACGACGAT CGCGATATAC GCAACTAAGT TAAAGATACG CGTGCGCAAG AGCCTCGTGA
 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060
 GTCGACCGC TTTGGCCGCC GCCCAGTCCT GCTCGCTTCG CFACTTGGAG CCACTATCGA CTACGCGATC
 CAGGCTGGCG AAACCGCGCG CCGGTCAGGA CGAGCGAAGC GATGAACCTC GGTGATAGCT GATGCGCTAG
 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130
 ATGGCGACCA CACCCGTCCT GTGGATCCTC TACGCGGGAC GCATCGTGGC CGGCATCACC GCGCCACAG
 TACCGCTGGT GTGGCGAGGA CACCTAGGAG ATGCGGCCCTG CGTAGCACCG GCCGTAGTGG CCGCGGTGTC
 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 GTGCGGTTGC TGCCGCTAT ATCGCCGACA TCACCGATGG GGAAGATCGG GCTCGCCACT TCGGGCTCAT
 CACGCCAACG ACCGCGGATA TAGCGGCTGT AGTGCTACC CCTTCTAGCC CGAGCGGTGA AGCCCGAGTA

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270
 GAGCGCTTGT TTCGGCGTGG GTATGGTGGC AGGCCCGGTG GCCGGGGGAC TGTGGGGCGC CATCTCCTTG
 CTCGCGAACA AAGCCGCACC CATACCACCG TCCGGGGCAC CGGCCCCCTG ACPACCCGCG GTAGAGGABC

4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340
 CATGCACCAT TOCTTGCGGC GCGGGTGTCT AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC CTAATGCAGG
 GTACGTGGTA AGGAAACGCC CCGCCACGAG TTGCCGGAGT TGGATGATGA CCCGACGAAG GATTACGTCC

4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410
 AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CGACCGATGC OCTTGAGAGC CTTCAACCCA GTCAGCTCCT TCCGGTGGGC
 TCAGCGTATT CCTCTCGCA GCTGGCTACG GGAACCTCTG GAAGTTGGGT CAGTCGAGGA AGGCCACCCG

4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480
 GCGGGGCTAG ACTATCGTCG CCGCACTTAT GACTGTCTTC TTTATCATGC AACTCGTAGG ACAGGTGCGG
 CGCCCGTAC TGATAGCAGC GGCCTGAATA CTGACAGAAG AAATAGTAGC TTGAGCATCC TGTCACGGC

4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550
 GCAGCGCTCT GGGTCATTTT CCGCGAGGAC CGCTTTCGCT GGAGCGCGAC GATGATCGGC CTGTCGCTTG
 CGTCGCGAGA CCCAGTAAAA GCCGCTCCTG CGCAAAGCGA CCTCGCGCTG CTACTAGCCG GACAGCGAAC

4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 CGGTATTCCG AATCTTGCAC GCCCTCGCTC AAGCCTTCGT CACTGGTCCC GCCACCAAC GTTTCGGCGA
 GCCATAAGCC TTAGAACGTG CGGGAGCGAG TTOGGAAGCA GTGACCAGGG CGGTGGTTTG CAAAGCCGCT

4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690
 GAAGCAGGCC ATTATCGCCG GCATGGCGGC CGACGCGCTG GGCTACGTCT TGCTGGCGTT CGCGACGCGA
 CTTGCTCCGG TAATAGCGGC CGTACCGCCG GCTGCGCGAC CCGATGCAGA ACGACCGBAA GCGCTCGCT

4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760
 GGCTGGATGG CCTTCCOCAT TATGATCTT CTGCTTCCG GCGGCATCGG GATGCCCGCG TTGACGGCCA
 CGACCTACC GGAAGGGGTA ATACTAAGAA GAGCGAAGGC CGCCGTAGCC CTACGGGGCG AACGTCCGGT

4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830
 TGCTGTCCAG GCAGGTAGAT GACGACCATC AGGGCAGCT TCAAGGATCG CTCGCGGCTC TTACAGCCTT
 ACGACAGGTC CGTCCATCTA CTGCTGGTAG TCCCTGTGCA AGTTCTTAGC GAGCGCCGAG AATGGTCGGA

4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 AACTTCGATC ATTGGACCGC TGATCGTCAC GCGGATTTAT GCCGCTCGG CGAGCACATG GAACGGGTTG
 TTGAAGCTAG TAACCTGGCG ACTAGCAGTG CCGCTAAATA CCGCGGAGCC GCTCGTGTAC CTTGCCCAAC

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970
 GCATGGATTG TAGGCGCCGC OCTATACCTT GTCTGCCTCC CCGCGTTGCG TCGCGGTGCA TGGAGCCGGG
 CGTACCTAAC ATCCGCGGCG GGATATGGAA CAGACGGAGG GGCACAACGC AGCGCCACGT ACCTCGGCC

4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 CCACCTCGAC CTGAATGGAA GCCGGCGGCA OCTCGCTAAC GGATTCACCA CTCCAAGAAT TGGAGCCCAT
 GGTGGAGCTG GACTTACCTT CCGCCGCCGT GGAGCGATTG CTAAGTGGT GAGGTTCTTA ACCTCGGTTA

5050 5060 5070
 CAATTCTTGC GGAGAACTGT GAATGCGCAA ACCAACC
 GTTAAGAACG CCTCTTGACA CTTACGCGTT TGGTTGG

FIG. 5 (cont.)

Fig. 6

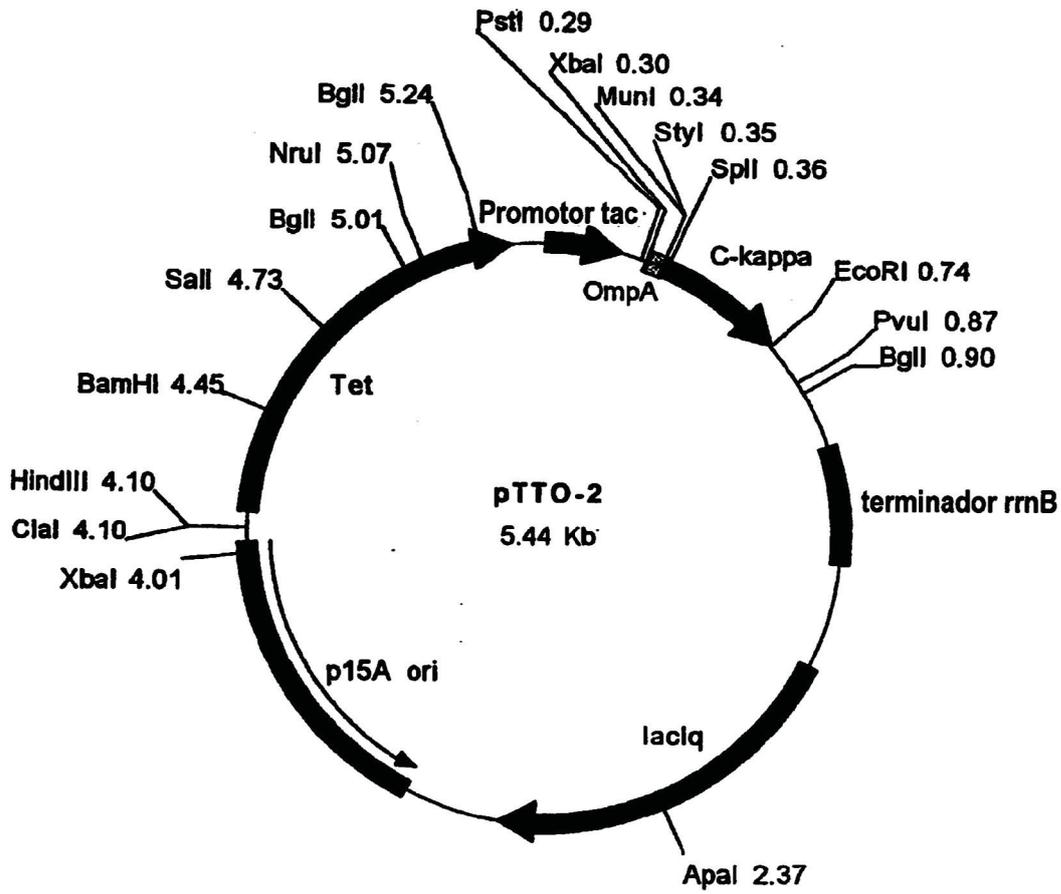
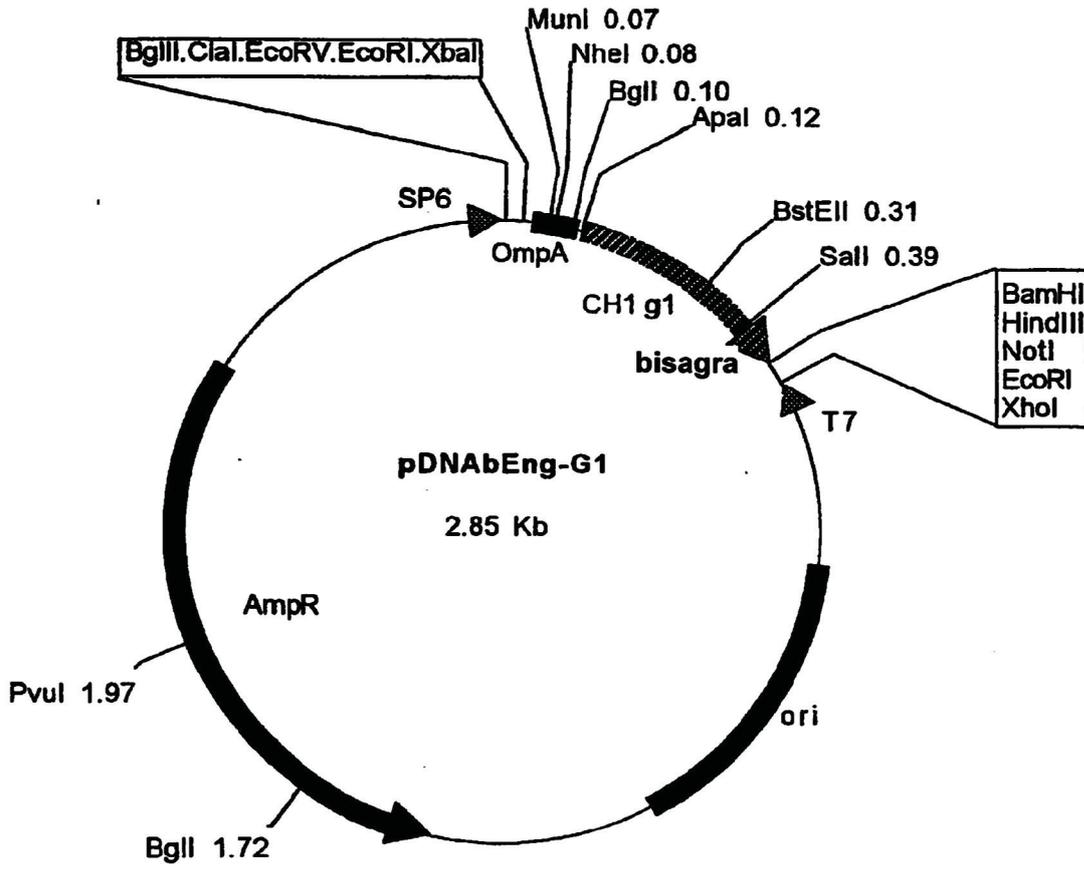


Fig. 7



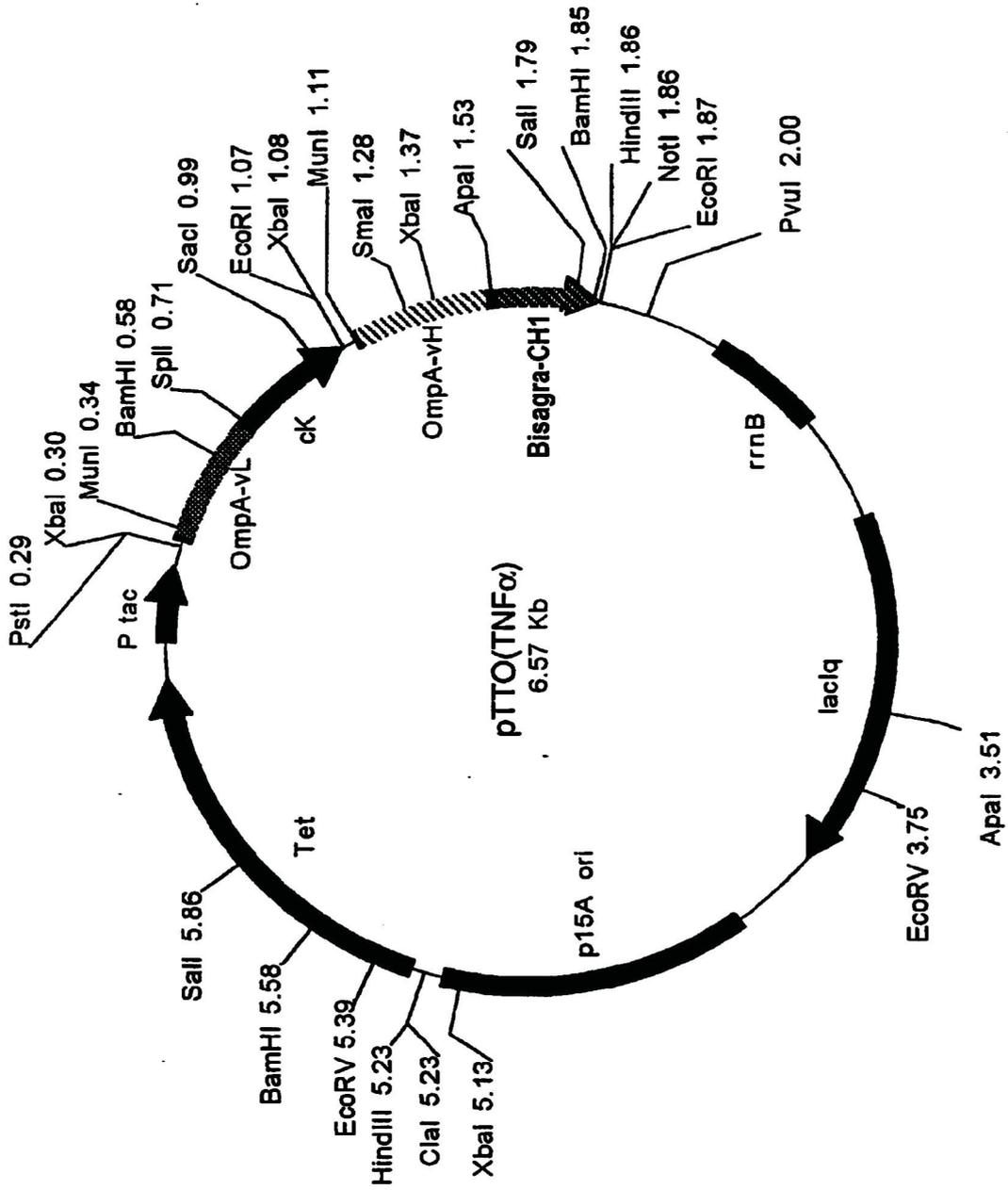


Fig. 8

FIG. 9

CASETES OLIGONUCLEOTIDICAS QUE CODIFICAN DIFERENTES SECUENCIAS INTERGENICAS PARA EXPRESION DE Fab' EN E. Coli

CASETE IGS-1 Espacio intergénico = -1

SacI

3, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TAATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G

MunI

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Final de secuencia c-Kappa ->

Comienzo de secuencia OmpA ->

CASETE IGS-2 Espacio intergénico = +1

3, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA AATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

CASETE IGS-3 Espacio intergénico = +13

3, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

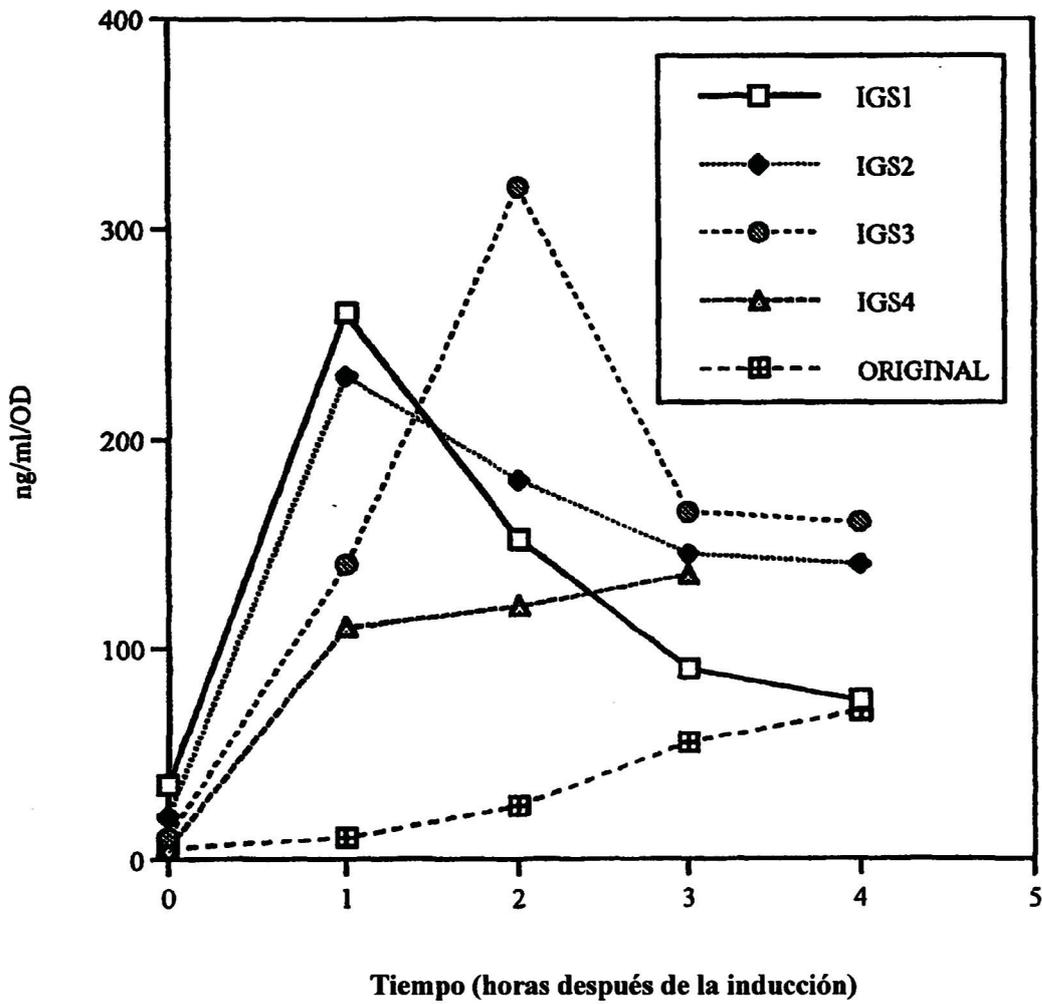
CASETE IGS-4 Espacio intergénico = +13

3, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGAGGATTATATAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Fig. 10

Acumulación periplásmica de Fab' – Variantes IGS



Construcción de variantes IGS de Fab' g163

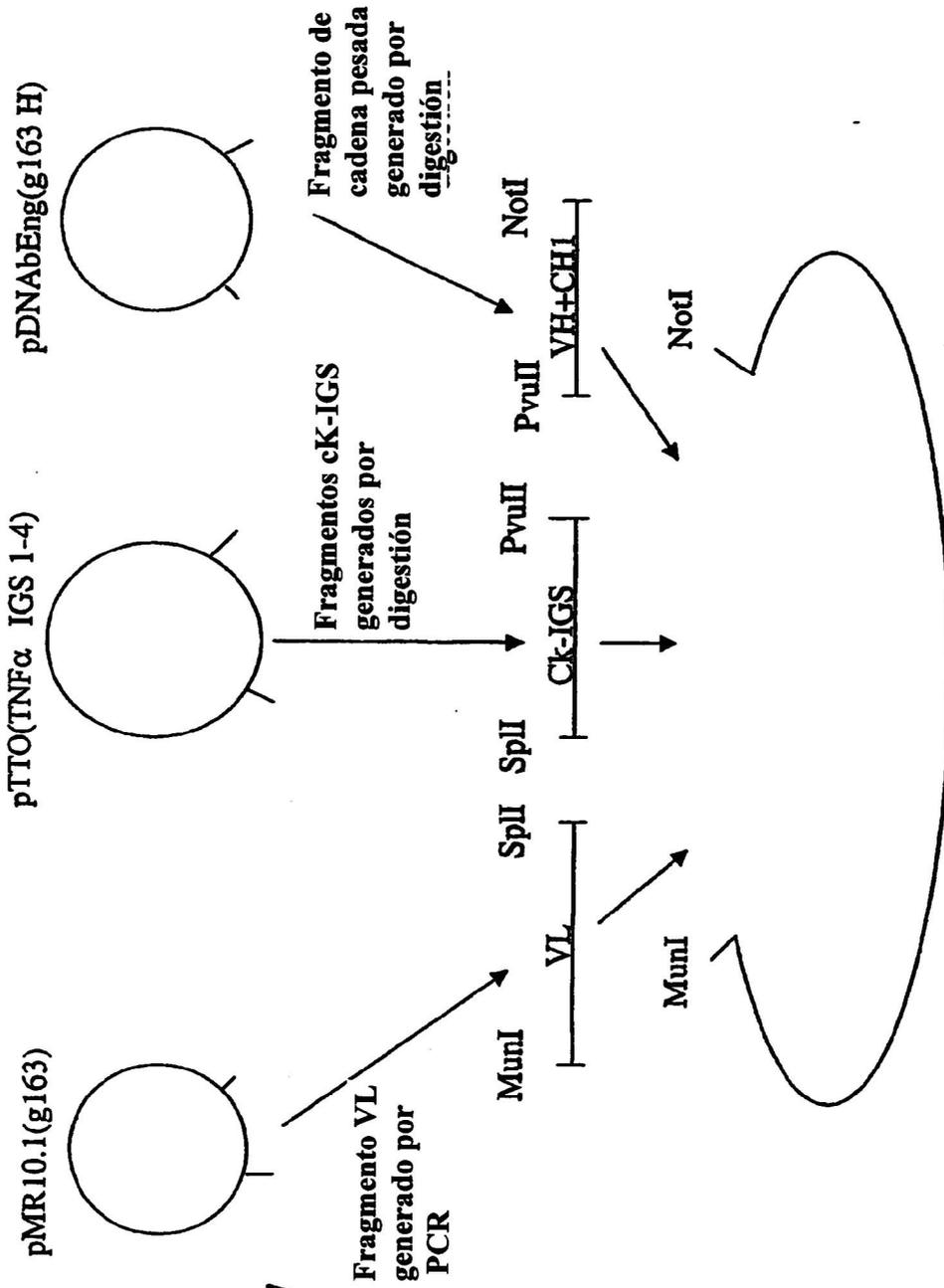
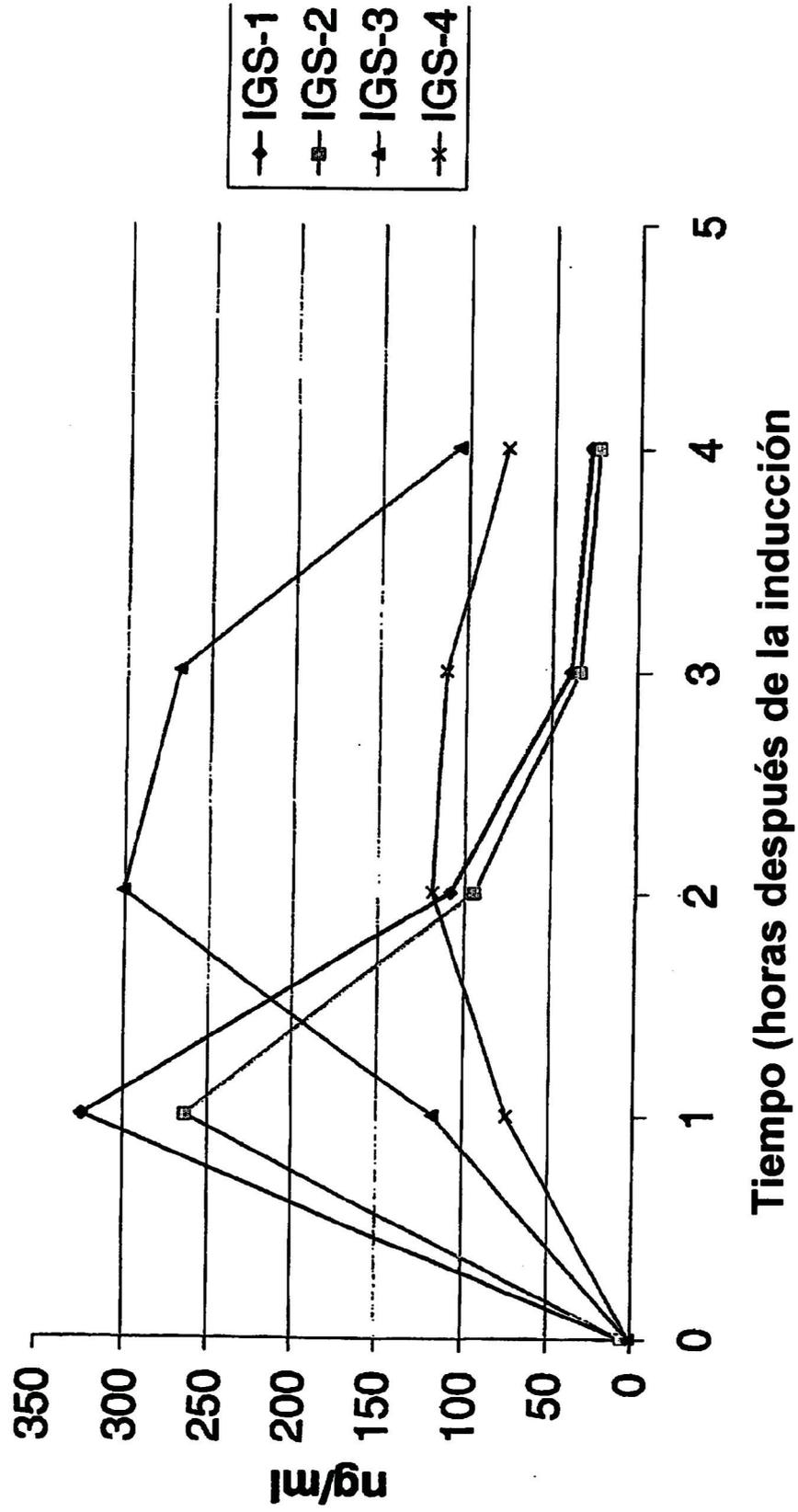


Fig. 11

Fig. 12
Expresión de Fab' g163 (matraz agitado)



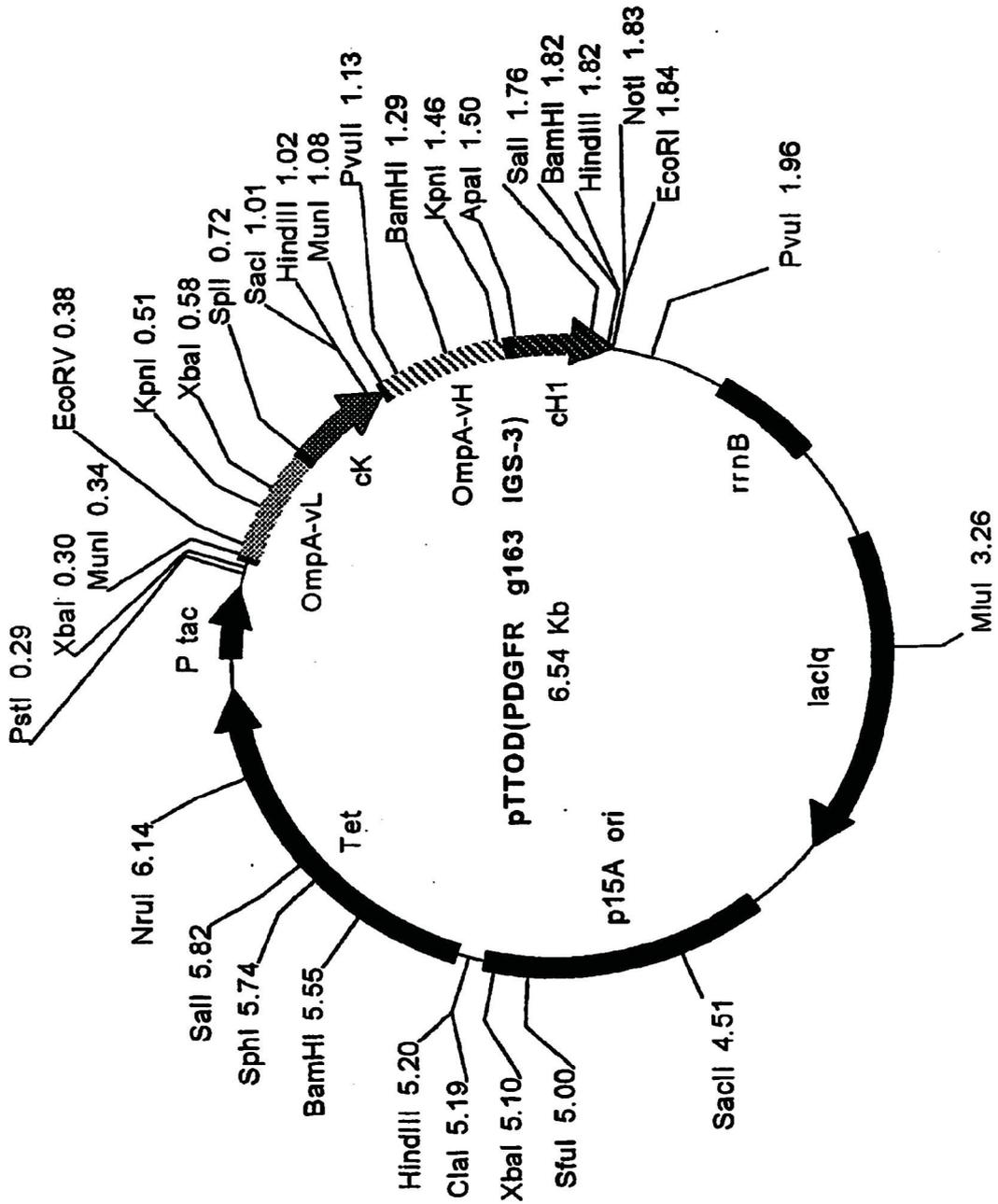


Fig. 13

Fig. 14
Efecto de la secuencia IGS sobre la concentración de Fab' g165
en cultivo desarrollado en matraz agitado

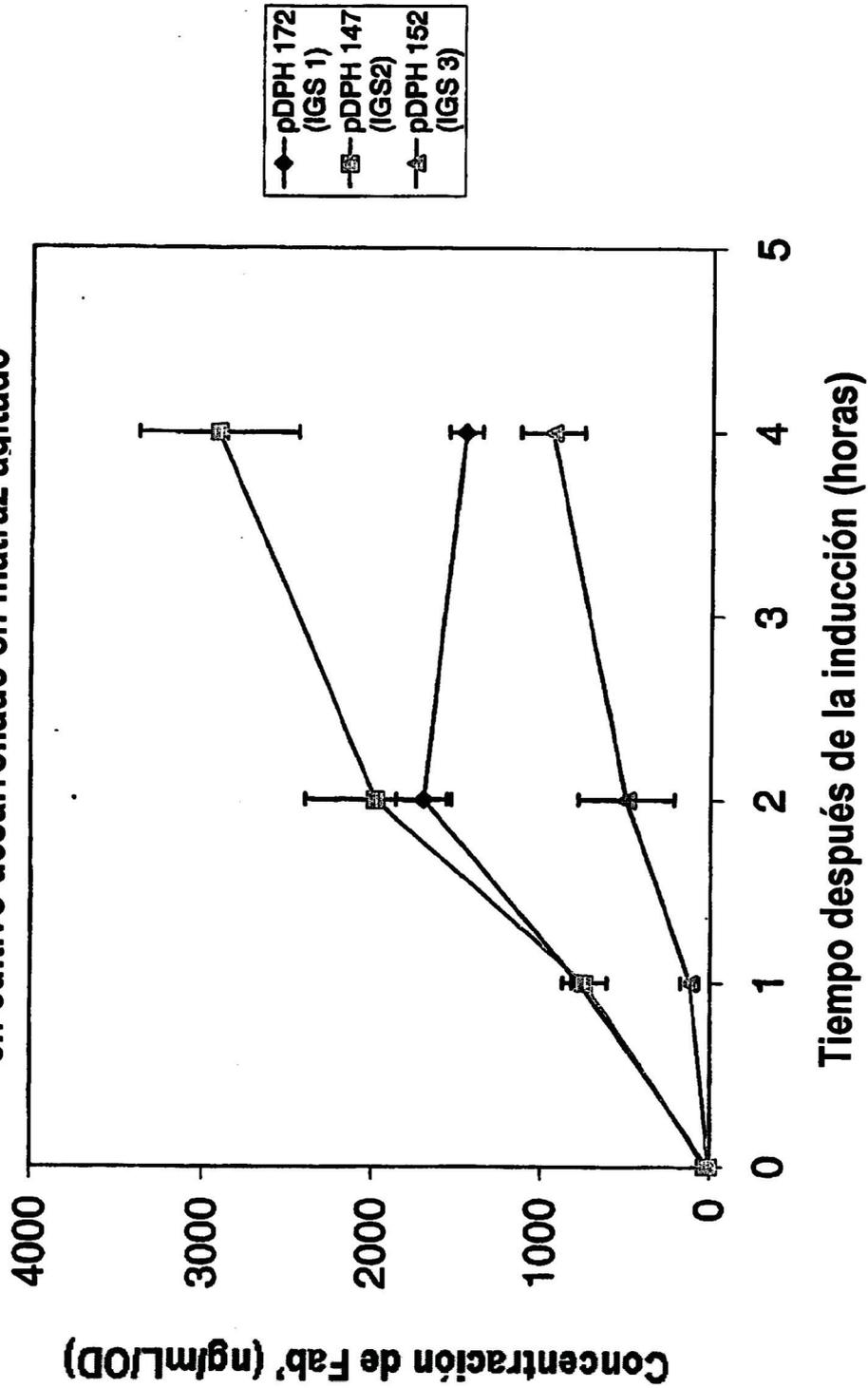


Fig. 15
Remdimientos de pTTOD(q165) en Fermentador

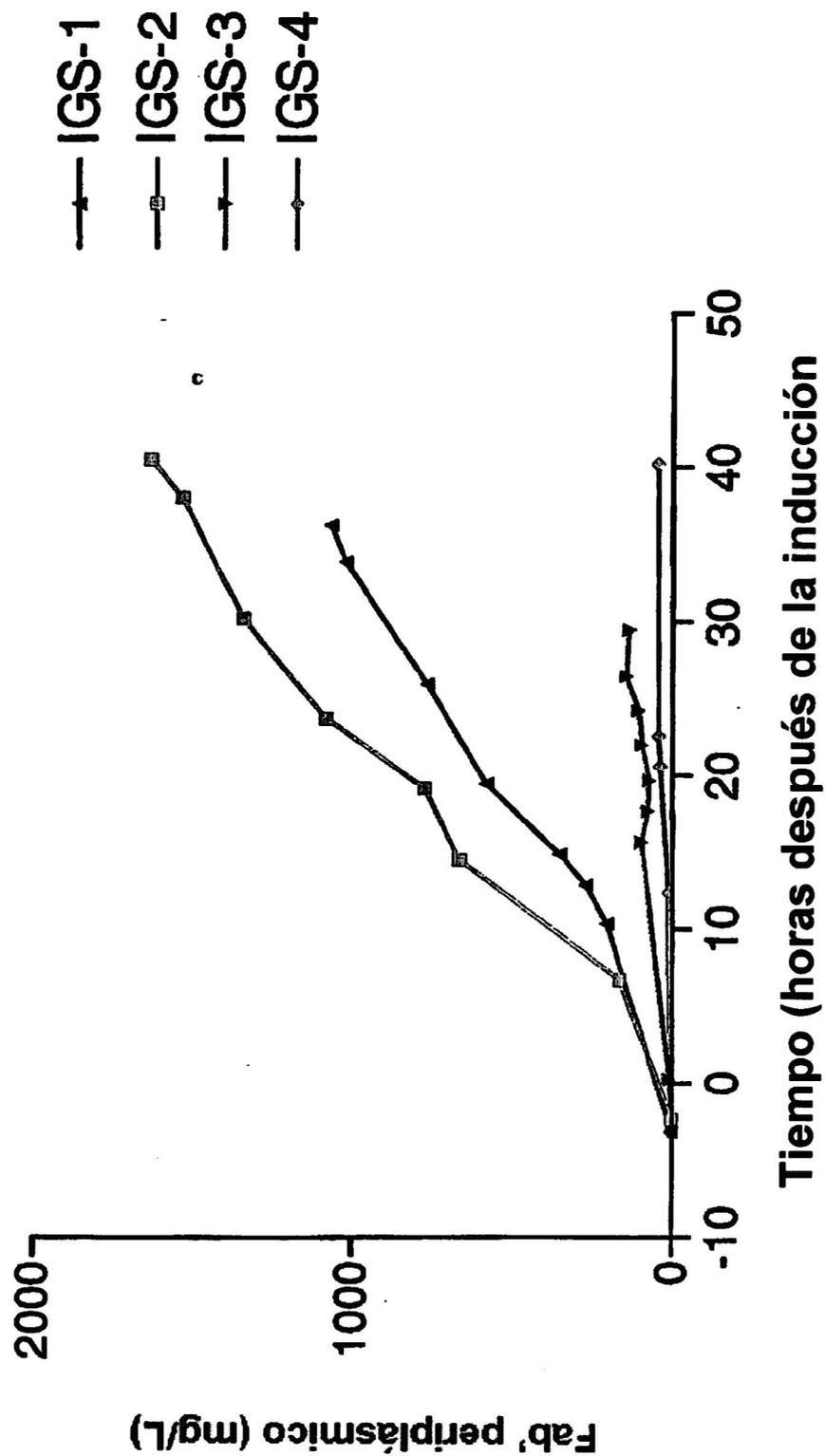


Fig. 16
Comparación de la expresión de Fab' de pTTO(gA33 IGS-2) y pTTO(gA33 IGS-3) en fermentación de 1 L

