

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 359**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717373 .7**

96 Fecha de presentación: **04.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1599578**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **MÉTODOS PARA PREVENIR LA GLUCONOILACIÓN DE PROTEÍNAS.**

30 Prioridad:
04.03.2003 US 451686 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2011

73 Titular/es:
**GLAXOSMITHKLINE LLC
ONE FRANKLIN PLAZA 200 NORTH 16TH
STREET
PHILADELPHIA, PA 19102, US**

72 Inventor/es:
**GARDNER, Alan, R.;
SWEITZER, Thomas, D.;
TAYLOR, Alexander, H. y
PATEL, Pramathesh, S.**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 359 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para prevenir la gluconoilación de proteínas

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención está en el campo de la ingeniería bioquímica. Más particularmente, esta invención se refiere a procedimientos de fermentación para producir polipéptidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 *Escherichia coli* ("*E. coli*") es un hospedante usado habitualmente para expresar proteínas para propósitos de investigación, diagnóstico, terapéuticos e industriales. Los sistemas de expresión modernos pueden lograr altos niveles de una amplia variedad de proteínas (Baneyx, *Current Opinion in Biotechnology* 10:411-421 (1999)). Sin embargo, la calidad de la proteína expresada con frecuencia es tan importante o más importante que la cantidad. Las proteínas expresadas en *E. coli* se pueden formar como agregados insolubles, o pueden tener aminoácidos mal incorporados (Bogosian, et al., *Journal of Biological Chemistry* 264:531-539 (1989)), o retener la metionina N-terminal (Chaudhuri, et al., *Journal of Molecular Biology* 285:1179-1194 (1999); Vassileva-Atanassova, et al., *Journal of Biotechnology* 69:63-67 (1999); Yamashita, et al., *Protein Expression & Purification* 16:47-52 (1999)). Además, se pueden producir modificaciones postraduccionales indeseadas tales como oxidación (Berti, et al., *Protein Expression & Purification* 11:111-118 (1997); Konz, et al., *Biotechnology Progress* 14:393-409 (1998)) o α -N-6-fosfogluconoilación (Geoghegan, et al., *Anal. Biochem.* 267:169-184 (1999); Kim et al., *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 57:759-762 (2001); Yan, et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 262:793-800 (1999) "Yan et al. I"; Yan, et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 259:271-282 (1999) "Yan et al. II"). Estas modificaciones pueden afectar adversamente a la actividad, estabilidad, estructura o inmunogenicidad de la proteína expresada, reduciendo en gran medida la utilidad de *E. coli* como hospedante para expresar polipéptidos.

25 Se ha descrito la alfa(α)-N-6-fosfogluconoilación de varias proteínas recombinantes fusionadas con marcadores de afinidad de hexahistidina ("marcadores hexa-His") (Geoghegan, et al.; Kim, et al.; Yan et al. I; Yan et al. II). En estos estudios, se encontró que un derivado de ácido glucónico se unía al extremo de la proteína recombinante. Todas estas proteínas se expresaron en cepas B de *E. coli*, usando vectores basados en pET (Novagen). Donde se indicaba, se usó medio LB. El aducto se detectó como una masa adicional asociada con el polipéptido de 258 Daltons ("Da"), que representaba la adición de la 6-fosfogluconolactona (6-PGL), o de 178 Da, que representaba la presencia de gluconolactona sin el fosfato. Se supuso que la fosfogluconoilación se producía en el grupo α -amino N-terminal por reacción con la 6-PGL endógena, un producto intermedio del ciclo de las pentosas fosfato. Se propuso que el aducto de +178 Da era el resultado de la actividad enzimática actuando en el aducto de +258 Da para eliminar el fosfato. Se mostró que la formación del aducto era específica para la secuencia de aminoácidos en el extremo N adyacente al marcador de His. Las secuencias polipeptídicas GXXHHHH, donde XX es SS, SA, AS, o AA, eran las más propensas a la α -N-6-fosfogluconoilación, mientras que SHHHHHH era menos propensa, y PHHHHHH y PFHHHHHH no se modificaban en absoluto (Geoghegan, et al.). No se detectaron modificaciones de otros grupos amino en ninguna otra parte de la proteína en experimentos in vivo o in vitro que usaron niveles altos de gluconolactona añadida. (Geoghegan, et al.)

40 Se ha mostrado que la fosfogluconoilación N-terminal inhibe la cristalización de proteínas (Kim, et al.), pero se sabe relativamente poco más sobre su efecto en la función, estabilidad o inmunogenicidad de la proteína. Se espera que la 6-PGL, que es un potente electrófilo, pueda estar implicada en reacciones de glicación in vivo (Rakitzis and Papandreou, *Chemico-Biological Interactions* 113:205-216 (1998)). La glicación de proteínas se ha estudiado ampliamente y se sabe que juega un papel fundamental en el envejecimiento y estados patológicos relacionados con complicaciones diabéticas (Baynes and Monnier, *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. Alan R. Liss, New York (1989)). Se ha mostrado que la delta-gluconolactona añadida de forma exógena, produce glicación de la hemoglobina, que puede ser un factor en las complicaciones vasculares de la diabetes (Lindsay, et al., *Clinica Chimica Acta* 263:239-247 (1997)). Además, la glicación de la alanina-aminotransferasa en el grupo epsilon-amino de la Lys 313 reduce notablemente su actividad catalítica (Beranek, et al., *Molecular & Cellular Biochemistry* 218:35-39 (2001)).

50 Se ha mostrado que la 6-fosfogluconolactonasa ("pgl") es una enzima esencial de la ruta de las pentosas fosfato, específicamente en la hidrólisis de PGL a ácido 6-fosfogluconico. (Miclet, et al., *J. Biol. Chem.* 276:34840-34846 (2001)). Se ha identificado el gen que codifica esta enzima en seres humanos (Collard, et al., *FEBS Letters* 459:223-226 (1999)), *Pseudomonas aeruginosa* (Hager, et al., *Journal of Bacteriology* 182:3934-3941 (2000)), y *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum* (Miclet, et al.). Aunque se ha observado la actividad de la pgl desde hace tiempo en *E. coli* (Kupor and Fraenkel, *Journal of Bacteriology* 100:1296-1301 (1969) "Kupor I" and Kupor and Fraenkel, *Journal of Biological Chemistry* 247:1904-1910 (1972) "Kupor II"), no se ha identificado la secuencia génica responsable de la codificación de una enzima con esta actividad (Cordwell, S. J. *Arch. Microbiol.* 172:269-279 (1999)). Se ha sugerido que además de permitir el flujo metabólico por el ciclo de las pentosas fosfato, la actividad de la pgl dentro de la célula previene la acumulación de 6-PGL y las consiguientes reacciones perjudiciales con nucleófilos intracelulares (Miclet, et al.). Las observaciones descritas de fosfogluconoilación de proteínas en el extremo N,

apoyan la hipótesis de que la 6-PGL producida en la ruta puede modificar proteínas, pero no se han descrito pruebas de que la modulación de la actividad de la pgl pueda afectar a los niveles de proteína modificada.

Además, la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) es un hospedante usado habitualmente para expresar proteínas con propósitos de investigación, diagnóstico, terapéuticos e industriales, Studier, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1986 May 5; 189(1):113-130. Esta cepa es comercialmente atractiva porque alcanza niveles muy altos de expresión de proteína recombinante mediante acoplamiento de la expresión de una copia cromosómica de la RNA-polimerasa de T7 y el uso de un promotor de RNA-polimerasa de T7 basado en plásmido en la proteína recombinante de interés. De acuerdo con esto, puesto que la RNA-polimerasa de T7 es una RNA-polimerasa extremadamente selectiva y activa, la transcripción de la proteína recombinante se acumula con niveles muy altos, con frecuencia incluso hasta el punto de que disminuyen los transcritos de la célula hospedante.

Desafortunadamente, la cepa BL21(DE3) libera muy lentamente, aunque detectable, partículas de fago lambda infeccioso, del orden de 10-20 unidades formadoras de placa/ml (UFP), Stewart Shuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 89:3489-3493. Según parece, se introdujo el gen de la RNA-polimerasa de T7 en el cromosoma de la célula hospedante BL21 mediante transducción con el fago lambda defectuoso DE3 que llevaba el gen de la RNA-polimerasa de T7 insertado en el gen *int* de lambda, Studier, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1986; 189(1):113-130. El profago defectuoso resultante no puede replicarse normalmente debido a la interrupción del gen *int*. La escisión cromosómica del profago DE3 es un requisito para la replicación del profago antes del empaquetamiento y liberación de partículas de fago infeccioso, y depende de la recombinación de la escisión homóloga que es dirigida por el producto del gen *int*. Como se describe en la presente memoria, niveles muy bajos de partículas de fago liberadas son debidos a sucesos de escisión del profago aleatorios independientes de *int*. Aunque la liberación de niveles muy bajos de partículas de fago infeccioso puede ser aceptable en algunos laboratorios de investigación, cualquier liberación de fago infeccioso es totalmente inaceptable en el marco de instalaciones de fabricación biofarmacéuticas, tanto debido a consideraciones de seguridad para el paciente como a que la liberación de agentes infecciosos puede poner en riesgo otros procedimientos de fabricación basados en *E. coli*.

Es muy necesario un método para expresar o sobreexpresar polipéptidos en un microorganismo, tal como *E. coli*, con una menor incidencia de fosfogluconoilación durante la fermentación. Además, sería muy conveniente la creación de una célula hospedante BL21(DE3) totalmente libre de fagos, para fabricar proteínas recombinantes terapéuticas en el formato de *E. coli*.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados por microorganismos, mediante crecimiento del microorganismo en medio de cultivo rico.

La presente descripción también proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados por microorganismos, que incluyen introducir (por ejemplo, transformar, infectar o transfectar) DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de pgl en el microorganismo. Este polipéptido puede ser una enzima fosfogluconolactonasa. En otro aspecto, la enzima fosfogluconolactonasa puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto a la enzima fosfogluconolactonasa producida por *Pseudomonas*, incluyendo, pero sin limitar, *P. aeruginosa*.

La presente descripción también proporciona microorganismos capaces de prevenir la gluconoilación de proteínas. En una realización, un microorganismo puede contener DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de pgl.

La presente descripción también proporciona un polinucleótido aislado que tiene una identidad de al menos 90% respecto al polinucleótido expuesto en el SEQ ID NO:7.

La presente descripción también proporciona un microorganismo sin expresión detectable de fago lambda infeccioso.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pECO-1-pgl-2-13.

La Figura 2 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pECO-1-pgl-2-13. (SEQ ID NO:9).

La Figura 3 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pET28ProL18Casp5.

La Figura 4 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pET28ProL18Casp5. (SEQ ID NO:13)

La Figura 5 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pET28proL18Casp5+pgl.

La Figura 6 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pET28proL18Casp5+pgl (SEQ ID NO:14).

La Figura 7 muestra una secuencia polinucleótida, SEQ ID NO:7.

La Figura 8 muestra una secuencia polipeptídica, SEQ ID NO:8.

Glosario

5 "Célula(s) hospedante(s)" es una célula, incluyendo pero sin limitar, una célula bacteriana o célula de un microorganismo, en la que se ha introducido (por ejemplo, transformado, infectado o transfectado) o se puede introducir (por ejemplo, transformar, infectar o transfectar) una secuencia polinucleótida aislada.

"Transformado" como se conoce en la técnica, es la modificación directa del genoma o episoma de un organismo mediante la introducción de DNA o RNA externo, o cualquier otra introducción estable de DNA o RNA externo.

"Transfectado" como se conoce en la técnica, es la introducción de DNA o RNA externo en un microorganismo, incluyendo, pero sin limitar, DNA o RNA recombinante.

10 "Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleótidas, según el caso, determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de conexión entre las secuencias polipeptídicas o polinucleótidas, según el caso, determinado por la correspondencia entre las hebras de dichas secuencias. La "Identidad" se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitar, los descritos en (Computational Molecular Biology,
 15 Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988)). Los métodos para determinar la
 20 identidad están diseñados para dar la mayor correspondencia entre las secuencias ensayadas. Además, los métodos para determinar la identidad están codificados en programas de ordenador disponibles por el público. Entre los métodos de los programas de ordenador para determinar la identidad entre dos secuencias se incluyen, pero no se limita, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible por el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). También se puede usar el conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Entre los parámetros para comparar secuencias polipeptídicas se incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

30 Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff and Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992).

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud del hueco: 4

35 Un programa útil con estos parámetros está disponible por el público como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con la no penalización por huecos terminales).

Entre los parámetros para comparar polinucleótidos se incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: correspondencias = +10, no correspondencias = 0

40 Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud del hueco: 3

Disponible como: El programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para las comparaciones de ácidos nucleicos.

45 A continuación se proporciona un significado preferido para "identidad" para polinucleótidos y polipéptidos, según el caso, en (1) y (2).

(1) Las realizaciones de polinucleótidos incluyen además un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleótida que tiene una identidad de al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% respecto a la secuencia de referencia del SEQ ID NO:7, en el que dicha secuencia polinucleótida puede ser idéntica a la secuencia de referencia del SEQ ID NO:7, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparado con la
 50 secuencia de referencia, en el que dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consta de al menos una

supresión, sustitución, incluyendo transición o transversión, o inserción de nucleótido, y en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en el que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100, y después restando este producto a dicho número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7, o:

$$n_n < x_n - (x_n \cdot y)$$

en el que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7, y es 0,95 para 95%, 0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y \cdot es el símbolo del operador de multiplicación, y en el que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea por defecto al número entero más cercano antes de restarlo a x_n . Las alteraciones de una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido pueden crear mutaciones sin sentido, sustitutivas, o con desplazamiento del marco de lectura en esta secuencia codificante, y por lo tanto pueden alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas alteraciones.

(2) Las realizaciones de polipéptidos incluyen además un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene una identidad de al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% respecto a una secuencia polipeptídica de referencia, en el que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparado con la secuencia de referencia, en el que dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consta de al menos una supresión, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácido, y en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia, o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en el que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100 y después restando este producto a dicho número total de aminoácidos, o:

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y)$$

en el que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia, y es 0,95 para 95%, 0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y \cdot es el símbolo del operador de multiplicación, y en el que cualquier producto no entero de x_a e y se redondea por defecto al número entero más cercano antes de restarlo a x_a .

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural, es decir, si se encuentra en la naturaleza, se ha cambiado o sacado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero este mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales con los que coexiste en su estado natural, está "aislado", incluyendo, pero sin limitar, cuando dicho polinucleótido o polipéptido se vuelve a introducir en una célula.

"Polinucleótido(s)" en general se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. "Polinucleótido(s)" incluye, sin limitación, DNA mono y bicatenario, DNA que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias o regiones mono, bi y tricatenarias, RNA mono y bicatenario, y RNA que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser regiones monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, "polinucleótido" tal como se usa en la presente memoria se refiere a regiones tricatenarias que comprenden RNA o DNA, o tanto RNA como DNA. Las hebras en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir toda la región de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región helicoidal triple es con frecuencia un oligonucleótido. Tal como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido(s)" también incluye DNA o RNA como se han descrito antes, que comprenden una o más bases modificadas. Por lo tanto, los DNA o RNA con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otras razones son "polinucleótido(s)" tal como se entiende este término en la presente memoria. Además, los DNA o RNA que comprenden bases poco comunes, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, sólo por nombrar dos ejemplos, son polinucleótidos tal como se usa el término en la presente memoria. Se observará que se han hecho una gran variedad de modificaciones al DNA y RNA que sirven para propósitos muy útiles para los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)" tal como se usa en la presente memoria, abarca dichas formas de polinucleótidos química, enzimática o metabólicamente modificadas, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células sencillas y complejas. "Polinucleótido(s)" también abarca polinucleótidos cortos, denominados con frecuencia oligonucleótido(s).

"Polipéptido(s)" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido(s)" se refiere tanto a cadenas cortas, normalmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a cadenas más largas denominadas en general proteínas. Los polipéptidos pueden comprender aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los "polipéptido(s)" incluyen los modificados por procedimientos naturales, tales como modificaciones en el

procesamiento y otras postraduccionales, pero también por técnicas de modificación química. Dichas modificaciones están descritas en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación, y son conocidas por los expertos en la técnica. Se apreciará que puede haber el mismo tipo de modificación con el mismo grado o distinto grado en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede comprender muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones se pueden producir en cualquier sitio en un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo. Entre las modificaciones se incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, glicosilación, unión de lípido, sulfatación, gamma-carboxilación de los restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por RNA de transferencia, tales como arginilación y ubiquitinación. Véase por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993), y Wold, F., *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12 en POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990), y Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992). Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden ser resultado de procesos postraduccionales naturales, y se pueden hacer también por métodos completamente sintéticos.

"Sistema(s) de expresión recombinante" se refiere a sistemas de expresión o sus partes, o polinucleótidos, introducidos o transformados en una célula hospedante o lisato de célula hospedante, para producir polinucleótidos y polipéptidos.

"Variante(s)" tal como se usa el término en la presente memoria, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia respectivamente, pero que retiene las propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar o no la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones de aminoácidos, proteínas de fusión y truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. En general, las diferencias están limitadas, de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy similares en su totalidad, y en muchas regiones idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, supresiones en cualquier combinación. Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede ser uno codificado o no por el código genético. La presente descripción también incluye variantes de cada uno de los polipéptidos, es decir, polipéptidos que varían de las referencias por sustituciones de aminoácidos conservativas, por las cuales un resto es sustituido por otro con características similares. Dichas sustituciones típicas son entre Al, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr, entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los restos básicos Lys y Arg; o restos aromáticos Phe y Tyr. Son particularmente preferidas las variantes en las que varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos son sustituidos, suprimidos o añadidos en cualquier combinación. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser una natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que sea natural. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no son naturales se pueden hacer por técnicas de mutagénesis, por síntesis directa y por otros métodos recombinantes conocidos por los expertos en la técnica.

"Microorganismo(s)" significa un (i) procarionta, incluyendo, pero sin limitar, un miembro del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomycetes*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Fancisella*, *Pasturella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Treponema*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* y *Mycoplasma*, e incluyendo además pero sin limitar, un miembro de la especie o grupo, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus* del Grupo C, *Streptococcus* del Grupo D, *Streptococcus* del Grupo G, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium leprae*, *Actinomycetes israelii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenterii*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*,

Treponema pallidum, *Rickettsia rickettsii* y *Chlamydia trachomatis*, (ii) un arqueón, incluyendo, pero sin limitar, *Archaeobacter*, y (iii) un eucariota unicelular o filamentoso, incluyendo, pero sin limitar, un protozoo, un hongo, un miembro del género *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, o *Candida*, y un miembro de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, o *Candida albicans*.

- 5 "Bacteria(s)(no)" significa un (i) procarionta, incluyendo, pero sin limitar, un miembro del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Fancisella*, *Pasturella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*,
 10 *Clostridium*, *Treponema*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* y *Mycoplasma*, e incluyendo además, pero sin limitar, un miembro de la especie o grupo, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus* del Grupo C, *Streptococcus* del Grupo D, *Streptococcus* del Grupo G, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*,
 15 *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium leprae*, *Actinomyces israelii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*,
 20 *Pseudomonas aeruginosa*, *Fransciscella tularensis*, *Brucella abortis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia rickettsii* y *Chlamydia trachomatis*, y (ii) un arqueón, incluyendo, pero sin limitar, *Archaeobacter*.

25 Tal como se usa en la presente memoria, "polipéptido(s) heterólogo(s)" se refiere a un polipéptido no sintetizado naturalmente por una célula o microorganismo hospedante transformado de interés, e introducido en la célula o microorganismo hospedante por DNA recombinante. Por ejemplo, *E. coli* puede actuar como un microorganismo hospedante para la expresión de interleuquina, la cual no se produce en una *E. coli* no transformada. Los polipéptidos heterólogos pueden incluir polipéptidos que se han modificado para facilitar el aislamiento.

30 Tal como se usa en la presente memoria, "marcador de afinidad" se refiere a cualquier resto asociado con una molécula que puede dar a dicha molécula una afinidad selectiva por otra sustancia o molécula. Por ejemplo, se puede usar un marcador de afinidad para facilitar la purificación de una molécula proporcionando a la molécula una afinidad selectiva por un material de empaquetamiento de columna. Un ejemplo no limitante de un marcador de afinidad es un marcador de His.

35 Tal como se usa en la presente memoria, "marcador de His" se refiere a una repetición de aminoácidos histidina, y puede incluir otros aminoácidos codificados en un polipéptido por técnicas de ingeniería. Típicamente, un marcador de His contiene al menos seis repeticiones de histidina ("hexa"), y está situado cerca del extremo N del polipéptido. Los marcadores de His se pueden usar para facilitar la purificación de polipéptidos heterólogos en columnas con Ni.

40 Tal como se usa en la presente memoria, "medio mínimo" se refiere al medio de crecimiento celular que comprende ingredientes químicamente definidos que incluyen, pero no se limitan, tampones tales como tampón de fosfato, sales tales como sulfato magnésico, cloruro cálcico, cloruro sódico, o sulfato de manganeso, minerales tales como hierro, cinc, cobre, cobalto, o molibdeno, una fuente de carbono tal como glucosa o glicerol, y una fuente de nitrógeno tal como sulfato o nitrato amónico. Un ejemplo es el medio M9 (Kim, YS, JH Seo and HY Cha, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003):460-465.)

45 Tal como se usa en la presente memoria, "medio rico" se refiere al medio de crecimiento celular que comprende ingredientes no definidos y que incluyen, pero no se limitan, componentes adicionales tales como tampones (por ejemplo tampón de fosfato), sales (por ejemplo sulfato magnésico, cloruro cálcico, cloruro sódico o sulfato de manganeso), y una fuente de carbono que puede ser glucosa o glicerol, por ejemplo. La fuente de nitrógeno puede estar compuesta por un hidrolisato de proteína tal como extracto de levadura, hidrolisato de carne, o hidrolisato de soja. La fuente de nitrógeno se puede proporcionar en una concentración capaz de mantener el crecimiento celular, con una relación de fuente de nitrógeno complejo (en gramos por litro) a densidad celular máxima (en unidades de DO) de 1:1 o mayor. Entre los ejemplos de medio rico se incluyen, pero no se limitan, Superbroth (Atlas RM, *Handbook of Microbiological Media*; Parks LC Ed.; CRC Press: Boca Raton FL, pp. 281, 523, 529, 859), caldo de Teriffic (Alpha Biosciences, Baltimore, MD EE.UU.), Caldo Turbo (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD EE.UU.), o caldo Hyper (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD EE.UU.).

55 Tal como se usa en la presente memoria, "gluconoilación" se refiere a la unión de un derivado de ácido glucónico a una proteína. La gluconoilación puede incluir, pero no se limita, la formación de aducto de 6-fosfogluconolactona (6-PGL), acetilación, formilación, desformilación, gluconolactonación, o derivatización con ácido glucónico.

Tal como se usa en la presente memoria, "rendimiento de la concentración" se refiere a la concentración de un producto (por ejemplo, polipéptido expresado heterológamente) en solución (por ejemplo, caldo de cultivo, o mezcla

de lisis celular o tampón) y normalmente se expresa como mg/l o g/l. Un aumento del rendimiento de la concentración se puede referir a un aumento absoluto o relativo de la concentración de un producto producido en dos conjuntos definidos de condiciones.

5 Tal como se usa en la presente memoria, "actividad de pgl" se refiere a cualquier actividad de una 6-fosfogluconolactonasa ("pgl"). Dicha actividad puede incluir hidrólisis de 6-PGL a ácido 6-fosfogluconico. La actividad de pgl significativa se puede definir como actividad de hidrólisis de al menos 0,2 UI/min/g.

10 Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "condiciones rigurosas" y "condiciones de hibridación rigurosas" significan que la hibridación se producirá sólo si hay una identidad de al menos 70% y preferiblemente al menos 80%, pero especialmente preferiblemente al menos 95% entre las secuencias. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es incubación toda la noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y DNA de esperma de salmón fraccionado y desnaturalizado 20 microgramos/ml, seguido de lavado de los filtros en 0,1xSSC aproximadamente a 65°C. Las condiciones de hibridación y lavado son conocidas y ejemplificadas por Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989),
15 particularmente en su capítulo 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Las tensiones celulares que provienen del crecimiento en medio mínimo, altas densidades celulares, y alto nivel de expresión de polipéptido heterólogo, entre otras tensiones, pueden contribuir a la gluconoilación del polipéptido heterólogo. Por lo tanto, aliviar uno o más de estos factores de tensión puede afectar al nivel de gluconoilación de la proteína expresada en el microorganismo, que a su vez puede afectar a la pureza y rendimiento de la concentración de un polipéptido deseado. Algunas cepas de *E. coli* pueden tener niveles mayores de actividad de pgl que otras (aunque no se ha identificado el gen responsable de esta actividad en *E. coli*. Cordwell, S.J. 1999. *Arch. Microbiol.* 172:269-279). Además, la gluconoilación de polipéptidos puede afectar a la cristalización y determinación estructural de estos polipéptidos.

25 La presente descripción, proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en un microorganismo, que comprenden hacer crecer dicho microorganismo en un medio de cultivo rico. En otro aspecto, el microorganismo no demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa significativa cuando se hace crecer en medio mínimo. El microorganismo puede ser una cepa de *E. coli*. En otro aspecto de la invención, una *E. coli* es una cepa B. En otro aspecto, un medio de cultivo rico comprende una fuente de nitrógeno complejo. Un medio de cultivo rico
30 puede mantener el crecimiento celular en una relación de concentración de fuente de nitrógeno complejo a densidad celular 1:1. Una fuente de nitrógeno complejo puede comprender triptona, peptona, o extracto de levadura. En otro aspecto, un medio de cultivo es Superbroth. El medio Superbroth puede estar doblemente concentrado. En otro aspecto, se transfecta un microorganismo con una molécula de DNA recombinante que codifica un polipéptido heterólogo.

35 En otra realización, se proporcionan métodos para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en *E. coli*, que comprenden fermentar una variedad de la cepa K de *E. coli* para expresar el polipéptido. En otro aspecto, una cepa K demuestra actividad de fosfogluconolactonasa al menos aproximadamente 100 veces mayor comparada con la cepa B hecha crecer sustancialmente en las mismas condiciones. En otro aspecto, una cepa K es K-12.

40 En otra realización, se proporcionan métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados en un microorganismo, que comprenden introducir DNA en el microorganismo, en el que el DNA codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto, un microorganismo es *E. coli*. Un DNA comprende DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto, un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto a un DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa de una *Pseudomonas*, que puede ser *P. aeruginosa*. En otro aspecto, un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:7. En otro aspecto, una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:8. Un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa comprende la secuencia expuesta en el SEQ ID NO:7. El DNA puede ser DNA recombinante,
50 y/o se puede transformar en un DNA genómico de un microorganismo.

En otra realización, se proporciona un microorganismo que puede prevenir la gluconoilación de polipéptidos. Un microorganismo comprende DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. Un microorganismo comprende DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto, un DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa de una *Pseudomonas* y en el que el microorganismo no es *Pseudomonas*. En otro aspecto de la invención, un DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa es de *P. aeruginosa*. En otro aspecto, un microorganismo es una cepa de *E. coli*. En otro aspecto, un microorganismo es una cepa de *E. coli*, en el que se incorpora un DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa en el genoma del microorganismo.

5 En otra realización, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al polinucleótido expuesto en el SEQ ID NO:7. En otro aspecto, un polinucleótido aislado comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:8. En otro aspecto, un DNA codifica una proteína que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto, se expone una secuencia de DNA en el SEQ ID NO:7. En otro aspecto de la invención, una secuencia de DNA es homóloga a un DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa de *P. aeruginosa*. En otro aspecto, un polinucleótido aislado comprende además un polinucleótido que codifica una interleuquina-18 humana, o sus variantes.

En otra realización, se proporcionan métodos para mejorar la formación de cristal del polipéptido, que comprenden expresar dicho polipéptido por un método de la invención, con el fin de reducir la gluconoilación del polipéptido.

15 En otra realización, se proporcionan métodos para mejorar la eficacia del crecimiento y expresión de un polipéptido en un microorganismo. En un aspecto, un polipéptido demuestra un mayor rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación comparado con el polipéptido gluconoilado.

En otra realización, se proporcionan métodos para producir una interleuquina humana, que comprenden coexpresar dicha interleuquina humana en un microorganismo con una enzima que tiene actividad de 6-fosfogluconolactonasa ("pgl"). En un aspecto, una interleuquina humana es una proteína IL-18, o sus variantes. En un aspecto, un microorganismo es *E. coli*. En un aspecto, la pgl es codificada por un polinucleótido que es transformado o transfectado en *E. coli*, incluyendo, pero sin limitar, ser transformado en el genoma o episoma.

20 En otra realización, se proporcionan métodos para producir una interleuquina humana, que comprenden expresar la interleuquina humana en un microorganismo que se hace crecer en un medio de cultivo rico. En un aspecto, una interleuquina humana es una proteína IL-18, o una de sus variantes. En otro aspecto, el microorganismo es *E. coli*. En un aspecto, un medio de cultivo rico comprende peptona de fitona. En un aspecto, un medio de cultivo rico comprende extracto de levadura Bacto.

En otra realización, se proporciona un microorganismo sin expresión detectable de fago lambda infeccioso. En un aspecto, se suprime o altera la proteína estructural de la cápside del fago lambda, gpE, en un microorganismo. La supresión o alteración de una proteína se puede lograr de varias formas no limitantes. Se puede eliminar parcial o completamente de un microorganismo un gen que codifica una proteína. Un gen que codifica una proteína se puede modificar genéticamente mediante técnicas no limitantes tales como mutación puntual o mutación aleatoria. Una proteína se puede escindir o modificar química o enzimáticamente para alterar su estructura o función. Se puede alterar o suprimir la expresión de un gen regulador promotor para eliminar o reducir la expresión del gen. Se pueden regular las condiciones de la solución o temperatura para afectar a la estructura o función de la proteína. En un aspecto, un microorganismo es una *E. coli*. En otro aspecto un microorganismo comprende un gen de RNA-polimerasa de T7.

Los siguientes ejemplos ilustran diferentes aspectos de la invención. Estos ejemplos no limitan el alcance de esta invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 Se creó una cepa mejorada de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que no tiene expresión detectable de fago lambda infeccioso, por supresión de la expresión de una proteína estructural principal de la cápside del fago lambda, gpE. Esta cepa se usó en los Ejemplos presentados en la presente memoria.

Se amplificó por PCR un fragmento interno de 413 pares de bases de la región que codifica gpE usando la pareja de cebadores:

5' AGCTGGCCATTGCTCAGGTCAAG 3' (SEQ ID NO: 1)

45 5' GTACTGTCCGGAATACACGACGATG 3' (SEQ ID NO:2)

y DNA cromosómico de BL21(DE3) como molde. El fragmento resultante:

AGCTGGCCAT TGCTCAGGTC GAAGAGATGC AGGCAGTTTC TGCCGTGCTT AAGGGCAAAT
 ACACCATGAC CGGTGAAGCC TTCGATCCGG TTGAGGTGGA TATGGGCCGC AGTGAGGAGA
 ATAACATCAC GCAGTCCGGC GGCACGGAGT GGAGCAAGCG TGACAAGTCC ACGTATGACC
 CGACCGACGA **TATCGAAGCC** TACGCGCTGA ACGCCAGCGG TGTGGTGAAT ATCATCGTGT
 TCGATCCGAA AGGCTGGGCG CTGTTCCGTT CCTTCAAAGC CGTCAAGGAG AAGCTGGATA
 CCCGTCGTGG CTCTAATTCC GAGCTGGAGA CAGCGGTGAA AGACCTGGGC AAAGCGGTGT
 CCTATAAGGG GATGTATGGC GATGTGGCCA TCGTCGTGTA TTCCGGACAG TAC
 (SEQ ID NO:3)

5 producto de la amplificación por PCR, se clonó TA y se verificó la secuencia usando técnicas patrón. Después, se introdujo una copia funcional de un gen de resistencia al cloranfenicol en el sitio de EcoRV situado en el centro y mostrado en negrita en la secuencia de gpE clonada. Después la construcción del fragmento de gpE interrumpido con cloranfenicol se usó como un vector knock-out de recombinación homóloga lineal para la supresión de la expresión genética del gen de gpE de lambda (DE3) que reside en la cepa hospedante BL21(DE3) de *E. coli*. El vector knock-out se introdujo en la célula hospedante exactamente como describen Kirill A. Datsenko y Barry Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2000; 97:6640-6645, excepto que se usó el vector descrito en la presente memoria. Se identificaron preliminarmente los knock-outs para gpE putativos por la capacidad de crecimiento en presencia de cloranfenicol 6 µg/ml, y posteriormente se confirmaron por análisis por PCR. Se depositó uno de dichos knock-outs para gpE de BL21(DE3), con la designación en GSK ECC-023.

15 Se ensayó en ECC-023 la presencia de partículas de fago infeccioso en un ensayo de placa muy sensible. Como se muestra en la Tabla 1, el BL21(DE3) padre, expresaba cantidades apenas detectables de fago cuando no se inducía a hacerlo, aproximadamente 20 ufp, pero aproximadamente tres órdenes de magnitud más cuando se inducía por la respuesta SOS al daño genético (irradiación UV). Sin embargo, el derivado knock-out para gpE, ECC-023, no producía ninguna prueba de fago infeccioso, incluso cuando se trató de inducir la respuesta SOS. Los datos muestran que el derivado de BL21(DE3), ECC-023, no produce ninguna partícula de fago infeccioso detectable, y de acuerdo con esto es una cepa de célula hospedante adecuada para la fabricación biofarmacéutica.

Tabla 1: Producción de partículas de fago infeccioso de E. coli.

	UFP/ml	
	<u>No inducido</u>	<u>Inducido por SOS</u>
BL21(DE3)	21	10.000
ECC-023	0	0

20 Ejemplo 2

Este ejemplo muestra que cultivar células en un medio rico puede prevenir la formación de un aducto de 6-PGL de proteínas marcadas con His, comparado con el medio mínimo.

25 Se hizo crecer *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET28FabZSa, que codifica el gen para Hexa-His-FabZ, en MCJK (medio mínimo) o MCJKLB (medio rico) a 37°C, hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 1,0. En la Tabla 2 se describen las composiciones de los medios para MCJK y MCJKLB.

Tabla 2: Composiciones de los medios para producir Hexa-His-FabZ

Componente	MCJK	MCJKLB
K ₂ HPO ₄	56 mM	56 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	38 mM	38 mM
MgSO ₄	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM
Metales en trazas*	1 ml/l	1 ml/l
Glucosa	10 g/l	10 g/l

Componente	MCJK	MCJKLB
Extracto de levadura	nada	5 g/l
Triptona Bacto	nada	10 g/l
*Metales en trazas: FeCl ₂ 161 mM, Na ₂ MoO ₄ 2,7 mM, ZnSO ₄ 1,4 mM, MnCl ₂ 2,5 mM, CuSO ₄ 3,2 mM, CoCl ₂ 3,4 mM, y H ₃ BO ₃ 3,2 mM		

Se añadió isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido ("IPTG") con una concentración final 1 mM, y las células se mantuvieron a 37°C durante cuatro horas hasta la recolección. Las células se recogieron por centrifugación a 16.000 x g durante 10 min y se lisaron por agitación suave en Tris 10 mM, pH 8,0, Na₂EDTA 1 mM, lisozima 10 µg/ml y Benzonasa 25 U/ml (Sigma). Se separaron los restos celulares por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos, y la proteína recombinante se purificó del extracto soluble con resina Ni-NTA en modo discontinuo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se analizó en las proteínas heterólogas la presencia de modificación con gluconolactona por análisis de LC/MS.

El polipéptido heterólogo MGSSH₄ con marcador de His se gluconoila en un nivel de 34% de la proteína recombinante total cuando el cultivo se lleva a cabo en medio mínimo (MCJK) como se muestra en la Tabla 3. Cuando el medio se complementa o se hace rico con extracto de levadura y triptona, la proteína gluconoilada no es detectable, como se muestra también en la Tabla 3. Por lo tanto, el uso de un medio más rico puede prevenir la formación del aducto de 6-PGL.

Tabla 3: Efecto de medio mínimo frente a rico en la gluconoilación de una proteína marcada con His expresada en *E. coli*

Vector	Extremo N	Inserto	% Modificado	Hospedante	Medio	Comentarios
pET28FabZSa	MGSSH ₆	FabZ	34%	BL21(DE3)	MCJK	medio mínimo
pET28FabZSa	MGSSH ₆	FabZ	No detectable	BL21(DE3)	MCJKLB	medio rico

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que un resto de lisina interno de una quimioquina CXC recombinante (también conocida como Gro-beta-T) puede ser gluconoilado cuando se expresa en *E. coli*. Las secuencias del cDNA y de aminoácidos de Gro-beta-T humano se proporcionan en la solicitud de patente Internacional, Publicación nº WO 92/00327 (9 de Enero, 1992), así como en la patente de EE.UU. nº 6.042.821 y patente de EE.UU. nº 6.413.510.

La acumulación de proteína heteróloga durante la producción de una quimioquina CXC (Gro-beta-T) se siguió de forma rutinaria usando un ensayo de fase inversa de alta producción, cuantitativo. Esta separación se conectó con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, de electropulverización ("ESI-TOF") y de alto rendimiento, para proporcionar un medio para seguir rutinariamente la formación de las variantes relacionadas con el producto.

Cuando se expresó en el hospedante *E. coli* BL21(DE3), sólo se observaron dos modificaciones del producto. La deconvolución de los espectros de masas caracterizó las variantes que presentaban desplazamientos de masa de +178 Da y +258 Da comparadas con el producto nativo a 7.542 Da.

El producto obtenido de estas fermentaciones se pasó por un procedimiento de purificación. Las muestras durante el procedimiento se caracterizaron usando un ensayo de fase inversa de alta resolución que puede resolver variantes minoritarias del producto. El análisis por cromatografía líquida-espectroscopía de masas ("LCMS") confirmó que las nuevas variantes del producto presentaban desplazamientos de masa de +258 Da (tiempo de retención ~14,8 min) y +178 Da (tiempo de retención ~15,2 min).

La bibliografía publicada indicaba que estos desplazamientos de masa de +178 Da y +258 Da se habían observado previamente en proteínas expresadas con marcadores de hexa-His, y que resultaban de la adición de 6-PGL o gluconolactona al resto N-terminal. La quimioquina CXC (Gro-beta-T) no se expresó usando un marcador de hexa-His. Además, la molécula no presenta ninguna región rica en histidina. Para confirmar que las especies estaban relacionadas con el producto, se aisló cada variante y se sometió a secuenciación N-terminal. La secuenciación confirmó la secuencia correcta del producto y aseguró que no había marcador de hexa-His.

Las variantes se sometieron a digestión con tripsina y cartografía del péptido. La comparación con los mapas de péptidos generados usando el producto patrón, puso de manifiesto dos nuevos picos en el mapa de tripsina, eluyendo el primer pico a 45,8 min (m/z 1094) y eluyendo el segundo pico a 46,5 min (m/z 1174). Los nuevos

péptidos se aislaron y sometieron a secuenciación N-terminal que indicó que ambos tenían la misma secuencia (NIQSVKVK (SEQ ID NO:4)). La homología de la secuencia y la presencia de una diferencia de masa de 80 Da sugería que las especies diferían sólo en la presencia de fosforilación.

5 Se llevó a cabo espectrometría de masas LCMS del pico con m/z 1174. El experimento de MS/MS confirmó que el pico tiene una secuencia de NIQSVKVK (SEQ ID NO:4). Además, los iones fragmento de la serie y empezando por y3 e incluyendo y3, y4, y5 e y6 mostraron un aumento de masa de 258 Da. Sin embargo, el ion y2 no mostró el aumento de masa de 258 Da. Estos datos indicaban que la modificación estaba en la lisina (nº 23 en la secuencia) con aumento de masa de 258 Da.

10 Para confirmar que la modificación observada se debía a la gluconoilación del producto, se desarrollaron reacciones in vitro que usaban L-glucono-1,5-lactona o ácido galactónico reactivo. Los trabajos previos habían mostrado que estas especies podían inducir la adición de especies gluconoilo al marcador hexa-His [Geohegan, et al.].

15 La quimioquina CXC (Gro-beta-T) purificada se intercambió con tampón en un tampón de TRIS a pH 8,0. Se añadieron L-glucono-1,5-lactona o ácido galactónico en una concentración 450 mM, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante veinte minutos. Ambas lactonas indujeron la misma modificación de +178 Da de la quimioquina CXC observada durante la expresión en *E. coli*.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la gluconoilación de los restos de lisina internos de una interleuquina humana recombinante (IL-18 humana) expresada en *E. coli*.

20 Se usó HPLC de fase inversa de alta resolución acoplada con espectrometría de masas ESI-TOF, para cribar los aductos de 6-PGL de un producto de interleuquina. El análisis de la interleuquina expresada en la cepa B dio una especie relacionada con el producto que presentaba una diferencia de masa de +178 Da. Puesto que la proteína se expresó sin un marcador de hexa-His, era probable que la modificación se produjera en un resto de lisina interno, como se había observado con la quimioquina CXC (véase el Ejemplo 3).

25 El análisis por HPLC de fase inversa de alta resolución de la molécula de Interleuquina permitió la identificación de múltiples especies del producto que presentaban desplazamientos de masa de +178 Da a RT de 21,0, 22,0, 23,0 minutos y una especie minoritaria adicional que presentaba un desplazamiento de +258 Da (RT ~27,5 minutos).

30 La modificación in vitro de la interleuquina también se evaluó con L-glucono-1,5-lactona a pH 8,0, como se ha descrito en el ejemplo previo. Esta reacción otra vez dio las mismas modificaciones de +178 Da observadas cuando se expresaba la interleuquina en la cepa B de *E. coli*.

Ejemplo 5

35 Este ejemplo muestra que cultivar células en medio rico previene la gluconoilación o formación de aducto de PGL de los restos de lisina internos de una proteína recombinante. En este estudio se compararon tres procedimientos de fermentación discontinua alimentada. La diferencia entre los experimentos de fermentación era el medio discontinuo y las composiciones de la alimentación usadas durante la fase de producción. Se usó un medio rico en el Procedimiento I de fermentación, mientras que los lotes segundo y tercero (Procedimientos II y III) se llevaron a cabo con un medio mínimo. Se usó glicerol como medio de alimentación en el Procedimiento I y II, mientras que se usó glucosa en el Procedimiento III.

40 El procedimiento de fermentación para producir una interleuquina recombinante en *E. coli* se llevó a cabo en un modo discontinuo alimentado en un fermentador de 15 litros. La fermentación se inició como un procedimiento discontinuo. Se preparó el inóculo mediante transferencia aséptica de 0,5 ml de un cultivo madre en glicerol a 1000 ml de medio PYE en un matraz de 2,8 litros, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de siembra para la expansión del inóculo en los fermentadores

Artículo	Concentración del medio discontinuo
Extracto de levadura	5 g/l
Peptona de fitona	10 g/l
Cloruro sódico	10 g/l
Dextrosa	10 g/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l

El cultivo se hizo crecer toda la noche a 27,5°C en un agitador rotatorio. Después el cultivo del matraz agitado se transfirió a un fermentador que contenía 5 litros de medio discontinuo. El medio de producción consta de sales, aminoácidos, y sulfato de kanamicina. Adicionalmente, el medio rico se complementa con altas concentraciones de extracto de levadura y peptona de fitona, como se muestra en la Tabla 5.

5 **Tabla 5: Composición del medio de la etapa de producción para comparar medio rico frente a mínimo**

Artículo	Concentración de medio discontinuo		
	Procedimiento I	Procedimiento II	Procedimiento III
Extracto de levadura	48 g/l	5,8 g/l	5,8 g/l
Peptona fitona	24 g/l	1,6 g/l	1,6 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	nada	5 g/l	5 g/l
NaCl	nada	1.3 g/l	1,3 g/l
Dextrosa	nada	nada	33,5 g/l
Glicerol	26 g/l	26 g/l	nada
K ₂ HPO ₄	15,3 g/l	6 g/l	6 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l	3 g/l	3 g/l
Metales en trazas*	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l
MgSO ₄	5 mM	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 nM	1 nM
Sulfato de kanamicina	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l

*Solución de metales en trazas: FeCl₂.6H₂O, 37,8 g/l; Na₂MoO₄.H₂O, 0,7 g/l; ZnSO₄.7H₂O, 0,4 g/l; MnCl₂.4H₂O, 0,5 g/l; CuSO₄.5H₂O, 0,8 g/l; CoCl₂.6H₂O, 0,8 g/l; H₃BO₃, 0,2 g/l.

El pH de cada medio se mantuvo a aproximadamente 7,3 usando hidróxido amónico. La temperatura se controló a aproximadamente 27,5°C. El medio de alimentación, glicerol o dextrosa se esterilizaron por separado y se conectaron asépticamente a un fermentador usando tubo de goma de silicona.

10 El suministro de medio de alimentación se inició cuando se redujo la cantidad del lote inicial en el cultivo. Un electrodo de oxígeno polarográfico seguía la presión de oxígeno disuelto en el fermentador. La velocidad de alimentación de carbono se controló en un modo de cascada para mantener constante la presión de oxígeno disuelto alrededor de 20%. La aireación se mantuvo a 10 l ptn/min y la presión a una sobrepresión de 0,49 kg/cm² de. Se usó una velocidad de agitación de 800 rpm desde el principio hasta el final del experimento de fermentación. A una DO₅₅₀ de aproximadamente 40 unidades, se inyectaron 100 ml de IPTG 1 mM en el cultivo para inducir la expresión génica recombinante.

15 El análisis por HPLC de fase inversa de las muestras recogidas 24 horas después de la adición de IPTG indicaban la reducción del nivel de gluconolactona en el producto. La ausencia de aducto de 6-PGL en el Procedimiento I, y su presencia en el Procedimiento II y III, indica que el uso de medio rico, y la fuente de carbono sin glicerol, eran responsables de la eliminación del aducto de 6-PGL. La Tabla 6 resume los resultados del análisis.

20 **Tabla 6. Análisis del aducto de fosfogluconolactona en tres procedimientos de fermentación para producir una interleuquina recombinante.**

Procedimiento n°	Aducto de fosfogluconolactona en interleuquina humana (IL-18)
Procedimiento I	Ausente
Procedimiento II	Presente
Procedimiento III	Presente

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra que la cepa K-12 de *E. coli* tiene actividad de pgl 100 veces mayor que la cepa B.

Se midió la actividad de 6-fosfogluconolactonasa en extractos de dos cepas diferentes con BL12(DE3) como madre, ECC005 y ECO680, y otras dos cepas originadas de un genotipo de K-12, ECO706 y ATG3995.

5 Para cultivar las cepas, en matraces de agitación de 2 litros que contenían 1 litro de medio PYE + glucosa al 1% y kanamicina 50 µg/ml, se inocularon 0,4 ml de suspensión celular de viales congelados. La incubación fue a 30°C con una agitación de 220 rpm durante 6 ó 7,5 horas. Se tomaron muestras en los puntos de tiempo indicados para medir la densidad óptica a 550 nm, y se recogieron sedimentos para medir la actividad de pgl. A continuación se presentan detalles del ensayo in vitro para medir la actividad de pgl.

10 La actividad de pgl se ensayó por fluorometría, a 340 nm y 25°C, en extractos sin células. Los extractos sin células se prepararon como se ha descrito previamente (Maitra and Lobo, *Journal of Biological Chemistry* 246: 475-488 (1971)); esencialmente con los mismos tampones de resuspensión, HEPES 50 mM pH 7,3 que contenía EDTA 5 mM y β-mercaptoetanol 5 mM, pero las células se rompieron por sonicación (5 ciclos de 20 s).

15 La pgl se ensayó usando un método previamente publicado (Sinha and Maitra *Journal of General Microbiology*, 1992; 138: 1865-1873) con algunas modificaciones. El ensayo consistía en una preincubación de 1 ml de mezcla que contenía glucosa-6-fosfato 50 µM, NADP+ 0,5 mM, y una unidad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en tampón de MES 100 mM, pH 6,5, que contenía KCl 25 mM y MgCl₂ 10 mM. Una vez que la reacción alcanzó la meseta, se siguió por adición de 2 unidades de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, que dio como resultado un lento aumento de la absorbancia debido a la hidrólisis espontánea de la 6-PGL formada durante la etapa de preincubación. Cuando se añaden los extractos sin células, cualquier aumento significativo de la fluorescencia se debe a la actividad de fosfogluconolactonasa. Todas las actividades de pgl se calcularon en el intervalo lineal del aumento de absorbancia después de la adición de extracto sin células.

20 La actividad enzimática se calculó restando la tasa de hidrólisis espontánea de la 6-PGL. Las actividades enzimáticas se expresaron en mmoles de NADPH por minuto y por mg de proteína total. La proteína total se determinó por el ensayo de proteínas con ácido bicinónico (BCA) (Pierce, Illinois, EE.UU.).

25 En las cepas basadas parentalmente en el genotipo de K-12, se ha detectado aumento de actividad de 100 veces más que en las cepas B.

La Tabla 7 resume los resultados de los ensayos enzimáticos en las dos familias de cepas.

Tabla 7: Actividad de fosfogluconolactonasa medida en cepas K-12 y B de *E. coli*.

CEPAS "K"		Cultivo	Actividad	Hidrólisis esp.
Cepa	Tiempo (h)		(mmoles de NADH/ min/mg de proteína)	(mmoles/min/mg de proteína)
ATCC 10798	5,5		1,061	0,0011
	6,5		2,899	0,0012
	7,5		2,584	0,0012
K-12 que expresa una interleuquina humana (IL-18)	7,5		3,539	0,0011
CEPAS "B"		Cultivo	Actividad	Hidrólisis esp.
Cepa	Tiempo (h)		(mmoles de NADH/ min/mg de proteína)	(mmoles/min/mg de proteína)
ATCC 47092	5,5		0,028	0,0012
BL21(DE3) que expresa una interleuquina humana (IL-18)	5,5		0,032	0,0012
	6,5		0,019	0,0011
	7,5		0,032	0,0012

Ejemplo 7

30 Este ejemplo muestra que la expresión de un polipéptido heterólogo, una quimioquina CXC (conocida también como Gro-beta-T) en la cepa BL21 de *E. coli* da como resultado el aducto de 6-PGL, mientras que la expresión del mismo

polipéptido en una cepa K-12 previene la gluconoilación de las lisinas internas.

Se llevaron a cabo diez experimentos de fermentación usando cuatro cepas diferentes de *E. coli* construidas para la expresión recombinante de una quimioquina CXC. Este ejemplo demuestra el efecto de la familia del hospedante frente al sistema promotor en la presencia de formación de aducto de 6-PGL de la proteína recombinante usando dos sistemas de expresión con cada familia celular del hospedante. La Tabla 8 describe las cepas que se usaron.

5

Tabla 8: Familia del hospedante y sistemas promotores usados para expresar una quimioquina CXC en *E. coli*

Cepa nº	Familia del hospedante	Sistema promotor
1	BL21 (DE3)	polimerasa de T7
2	K-12(DE3)	polimerasa de T7
3	BL21 (DE3)	Lambda pL
4	K-12	Lambda pL

La fermentación para producir la quimioquina CXC (Gro-beta-T) en *E. coli* se llevó a cabo en un modo discontinuo alimentado en un fermentador de 15 litros. La fermentación se inició como un procedimiento discontinuo. El inóculo se preparó por transferencia aséptica de 0,75 ml de un cultivo madre en glicerol a 100 ml de medio PYE a un matraz con tampón de 500 ml. El cultivo se hizo crecer durante 7 horas a 32,0°C en un agitador rotatorio. Después el cultivo del matraz agitado se mezcló con 1,0 litro de medio PYE y se transfirió a un fermentador que contenía 8,0 litros de medio discontinuo. El medio de producción constaba de sales y carbenicilina o sulfato de kanamicina dependiendo del promotor. Las formulaciones de los medios para la expansión de la semilla se proporcionan en la Tabla 9, y la formulación del medio para la producción de la quimioquina CXC en *E. coli* se proporciona en la Tabla 10.

10

15

Tabla 9: Formulación del medio para la expansión de la semilla.

Componente	Concentración
Extracto de levadura	5 g/l
Peptona de fitona	10 g/l
Cloruro sódico	10 g/l
Dextrosa	10 g/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l

Tabla 10: Formulación del medio para producir quimioquina CXC en *E. coli*

Componente	Concentración
Sulfato amónico	5 g/l
Fosfato potásico, dibásico	6 g/l
Fosfato potásico, monobásico	3 g/l
Cloruro sódico	1,3 g/l
Dextrosa	18 g/l
Sulfato magnésico	4,8 g/l
Biotina	1 mg/l
Metales en trazas*	10 ml/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l
	o
Carbenicilina	25 mg/l

*Solución de metales en trazas: FeCl₂.6H₂O, 3,78 g/l; Na₂MoO₄.H₂O, 0,7 g/l; ZnSO₄.7H₂O, 0,4 g/l; MnCl₂.4H₂O, 0,5 g/l; CuSO₄.5H₂O, 0,8 g/l; CoCl₂.6H₂O, 0,8 g/l; H₃BO₃, 0,2 g/l.

El pH de cada medio se mantuvo aproximadamente a 7,0 usando hidróxido amónico. La temperatura se controló a aproximadamente 32,0°C y se aumentó a aproximadamente 37,5°C en la inducción. El medio de alimentación y la dextrosa se esterilizaron por separado y se conectaron asépticamente a un fermentador usando un tubo de goma de silicona.

- 5 El suministro de medio de alimentación se inició cuando se redujo la cantidad del lote inicial en el cultivo. Un electrodo de oxígeno polarográfico seguía la presión de oxígeno disuelto en el fermentador. La velocidad de alimentación de carbono se controló en un modo de cascada para mantener constante la presión de oxígeno disuelto alrededor de 25%. La aireación se mantuvo a 10 l ptn/min y la presión a una sobrepresión de aproximadamente 0,49 kg/cm². Se usó una velocidad de agitación de aproximadamente 400 rpm al principio y se aumentó según fuera necesario para mantener una presión de oxígeno disuelto de aproximadamente 25%. A una DO₅₅₀ de aproximadamente 14 unidades, se inyectaron 100 ml de IPTG 1,0 mM en el cultivo, o la temperatura se aumentó a 37,5°C para inducir la expresión génica recombinante.

15 Ninguno de los experimentos de fermentación usando una familia de hospedante K-12 tenía formación de aducto de 6-PGL detectable en el polipéptido expresado de modo recombinante, mientras que los experimentos usando la cepa B junto con el promotor de T7 presentaban todos la presencia de formación de aducto de 6-PGL detectable en el polipéptido expresado de modo recombinante. Los tres experimentos usando la cepa B y el promotor de pL no tenían formación de aducto detectable. Estos datos demuestran que la expresión de una proteína recombinante en una cepa de hospedante que tiene actividad de pgl, por ejemplo, K-12, puede prevenir la formación de aducto de 6-PGL en proteínas recombinantes que son susceptibles a esta modificación, véase el Ejemplo 3. En la Tabla 11 se presenta la presencia de formación de aducto de 6-PGL en la quimioquina CXC expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli* para cada fermentación.

Tabla 11: Presencia de aducto de 6-PGL en quimioquina CXC expresada por el promotor de T7 o pL en cepas B y K12 de *E. coli*.

Genotipo de la cepa	Promotor	Experimento nº	Aducto de gluconolactona 5 h después de inducción [% de pico del producto]
B	T7	1	21,7
		2	5,8
		3	4,2
		Media	10,6
K-12	T7	1	0
		2	0
		Media	0
B	pL	1	0
		2	0
		3	0
		Media	0
K-12	pL	1	0
		2	0
		Media	0

Ejemplo 8

- 25 Este ejemplo muestra que la expresión de un polipéptido heterólogo, interleuquina humana (IL-18), en la cepa BL21 de *E. coli* da como resultado la formación de aducto de 6-PGL, mientras que la expresión del mismo polipéptido en una cepa K-12 prevendrá la 6-fosfogluconilación de las lisinas internas.

Se construyeron cepas BL21(DE3) y K-12 de *E. coli* para expresar una interleuquina humana (IL-18). Los cultivos se

hicieron crecer en medio mínimo como se describe en el Ejemplo. El seguimiento de la modificación del producto con 6-PGL se llevó a cabo en diferentes puntos de tiempo a lo largo del cultivo, usando métodos descritos en el Ejemplo.

- 5 Los resultados se expresan como proporciones de las áreas de los picos del producto sin modificar a producto modificado. Los números mayores indican una menor proporción de producto gluconoilado. Es evidente que el grado de gluconoilación en la cepa BL21 (DE3) es significativamente mayor que en la cepa K-12. La fosfogluconoilación de una interleuquina humana (IL-18) expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli* se resume en la Tabla 12.

Tabla 12: Fosfogluconoilación de una interleuquina humana expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli*.

Cepa de <i>E. coli</i>	Tiempo después de inducción (h)	Proporción de áreas de producto no modificado a producto modificado
K-12	16	58,4
	18	44,5
	20	N/d
	22	29,3
	24	30,0
BL21 (DE3)	22	8,3
	24	7,7
N/d = producto modificado no detectable		

Ejemplo 9

- 10 Este ejemplo ilustra que la sobreexpresión de pgl heteróloga en células hospedantes de *E. coli* conduce a una mayor conversión metabólica de la 6-PGL en su producto 6-fosfogluconato, reduciendo así el depósito de 6-PGL disponible para la formación de aducto. Se clonó un gen de pgl de *P. aeruginosa* y se introdujo por ingeniería en un sistema de vector de expresión inducible basado en plásmido que es compatible con plásmidos basados en el origen de replicación *colE1*, de modo que se pueden mantener dos plásmidos diferentes en la misma célula hospedante. El nivel de expresión inducible de pgl de *P. aeruginosa* se puede regular a voluntad, de una forma independiente de las rutas metabólicas endógenas de *E. coli* e independiente de la expresión inducible de la proteína recombinante de interés. De acuerdo con esto, la expresión de pgl recombinante se puede regular de modo que se disminuya el depósito de 6-PGL por debajo del nivel requerido para la formación de aducto, pero no en un grado en el que los recursos de la célula hospedante estén sustancialmente afectados. Por lo tanto, el nivel de la proteína recombinante deseada se puede regular por separado para dar niveles de expresión muy altos.

20 Clonación de pgl de *P. aeruginosa*

- Se clonó la pgl de *P. aeruginosa* como sigue. Se obtuvo *P. aeruginosa* del American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD 20852-1776): *Pseudomonas aeruginosa*, cepa ATCC 27853. Los cebadores para la amplificación por PCR 5' y 3' se designaron y sintetizaron para dirigir la amplificación por PCR del gen de pgl entero, incluyendo la región justo corriente arriba del codón de iniciación ATG. Las secuencias de los cebadores para la amplificación homoseno y antiseno son:

5' **GGCCTCGAGCTCGGTGGCCCTGGTGGCCC** 3' (SEQ ID NO:4)

y

5' **GCCCTCGAGTCCGCCACTCAGGGGTACCAAT** 3' (SEQ ID NO:5)

respectivamente. Las secuencias en negrita indican sitios XhoI introducidos en el gen para permitir las posteriores etapas de clonación.

- 30 Adicionalmente, se encontró que el gen de *P. aeruginosa* era muy rico en GC y no se amplificaría por PCR en las condiciones normales de amplificación. Se encontró que la amplificación por PCR requiere el uso de condiciones de amplificación por PCR que están optimizadas para moldes ricos en GC, específicamente Advantage-GC cDNA Polymerase Mix (cat. 8419-1; BD Biosciences Clontech: Palo Alto, CA; EE.UU.). La correspondiente secuencia de DNA de pgl (SEQ ID NO:7) que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:8 se amplificó por PCR a partir de células completas de *P. aeruginosa* después de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, seguido de 68°C durante 1,5 minutos. Después la amplificación se completó por una sola incubación a 68°C durante 3 minutos. El producto de la

35

5 PCR se aisló por electroforesis en gel de agarosa y cromatografía en columna en un kit de extracción en gel QIAquick (cat. 28704, Qiagen: Valencia, CA; EE.UU.). El DNA de pgl purificado en gel y amplificado, se eluyó en agua y se clonó inmediatamente en el vector de clonación pCR2.1 usando un kit TOPO TA Cloning® (cat. K4550-40, Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.) y se transformó en *E. coli* químicamente competente One Shot® TOP10 (cat. C4040-06, Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.). En las colonias amp^r resultantes se seleccionaron los insertos por digestión con EcoRI y se llevó a cabo electroforesis de los productos. Los insertos con secuencia verificada se liberaron del vector de clonación por digestión con XhoI y se purificaron usando el kit de extracción en gel QIAquick. El DNA del vector de expresión pECO-1 (BioCat 73552, GlaxoSmithKline: King of Prussia, PA; EE.UU.) se cortó con Sall y se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) (cat M0290S, New England Biolabs: Beverly, MA; EE.UU.), y después se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick. Los insertos digeridos con XhoI y el pECO-1 tratado con Sall, se ligaron usando DNA-ligasa de T4 esencialmente como describía el fabricante (cat. M0202S; New England Biolabs: Beverly, MA; EE.UU.). Dos microlitros (2 µl) de la reacción de ligazón se transformaron en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 como describía el fabricante (cat. C4040-06; Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.). Las colonias se cribaron según la presencia de insertos de pgl en la orientación correcta por PCR. Se seleccionó el clon pECO-1pglcl2-13 para estudio posterior como se expone a continuación.

20 La construcción resultante se basa en la cadena principal del plásmido pACYC184, y comprende los siguientes elementos funcionales genéticos: (1) p15A ori, que permite el mantenimiento del episoma plasmídico en la misma célula hospedante que los plásmidos heterólogos con el elemento ori de tipo colE1; (2) marcador seleccionable de cloranfenicol^r; (3) un promotor inducible de tetraciclina corriente arriba de un sitio de clonación múltiple; (4) gen de la pgl de *P. aeruginosa* de longitud completa.

La construcción final, pECO-1pglcl2-13, se transformó como se ha descrito antes en células BL21 (DE3) que expresan una interleuquina humana, para el estudio posterior. La secuencia de DNA de pECO-1pglcl2-13 se presenta como el SEQ ID NO:9 y el mapa de restricción de pECO-1pglcl2-13 se presenta en la Figura 1.

25 Los cultivos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 3. El análisis del aducto de 6-PGL se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4. La actividad de fosfogluconolactonasa se midió como se describe en el Ejemplo 6. Entre las cepas adicionales que expresan la interleuquina humana (IL-18) examinadas en el estudio, se incluye BL21 (DE3) sin pECO-1pglcl2-13 y K-12. Las cepas con el plásmido de pgl se examinaron con y sin adición de anhidrotetraciclina 20 ng/ml. Se expone un resumen de la presencia o ausencia de formación del aducto de 6-PGL en células que expresan pgl en la Tabla 13 mostrada a continuación.

Tabla 13: Impacto de la expresión de pgl en la fosfogluconoilación de una interleuquina humana

Cepa	Actividad máxima de pgl UI/min/g de PCS	Formación de aducto de 6-PGL en la interleuquina humana (IL-18)
BL21 (DE3)	0,002	Presente
BL21 (DE3) pECO-1pglcl2-13, sin tet	0,56 ± 0,13	Ausente
BL21 (DE3) pECO-1pglcl2-13, tet inducido	0,64 + 0,11	Ausente
K-12	0,96 ± 0,14	Ausente
PCS = peso de célula seca		

Este ejemplo ha demostrado que la coexpresión de fosfogluconolactonasa de *Pseudomonas* con la interleuquina humana (IL-18) previene satisfactoriamente la formación del aducto de 6-PGL en la cepa B de *E. coli*.

Ejemplo 10

35 La interleuquina-18 humana (IL-18) es una citoquina inmunomoduladora que se está desarrollando como un agente anticancerígeno para tratar carcinomas de células renales y melanomas malignos. Se presentan descripciones de la IL-18 humana y murina en las siguientes patentes de EE.UU.: Patente de EE.UU. n° 6.582.689, Patente de EE.UU. n° 5.914.253, Patente de EE.UU. n° 5.879.942, Patente de EE.UU. n° 5.912.324, Patente de EE.UU. n° 5.914.253, Patente de EE.UU. n° 6.060.283, Patente de EE.UU. n° 6.087.116, y Patente de EE.UU. n° 6.214.584. Se cree que la IL-18 estimula el sistema inmunitario, promueve la muerte de células tumorales inducida por Fas y la inmunidad mediada por célula. La secuencia polipeptídica de la IL-18 (SEQ ID NO:10) se puede producir en BL21 (DE3) de *E. coli*. Se puede expresar a partir de la secuencia polinucleótida para pro-IL-18 (SEQ ID NO:11), que después es procesada a IL-18 madura por una enzima de procesamiento, Caspasa 5, coexpresada en la misma célula.

5 Se clonó la 6-fosfonoglucolactonasa de bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa*, en una cepa BL21 (DE3). La producción de IL-18 en esta cepa produce IL-18 sin formación de aducto detectable que da como resultado un aumento directo del rendimiento del producto deseado. Además, la corrección de la deficiencia de pgl también ha dado como resultado un aumento >10% de la productividad específica. Por lo tanto, el efecto combinado de la calidad del producto y las mejoras de la productividad específica mediante el uso de esta cepa de producción modificada se ha traducido en un aumento >25% del rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación. Se espera que la eliminación de la formación de aducto tendrá un impacto positivo directo en el procedimiento de purificación y aumentará más el rendimiento global del procedimiento.

Ejemplo 11

10 La gluconoilación de la IL-18 se siguió por análisis por HPLC de la IL-18 producida en células BL21 (DE3) con y sin coexpresión de pgl. La formación de aducto se detectó como un hombro del pico que eluía aproximadamente dos minutos después de la IL-18 purificada. Cuando se expresó la IL-18 en y se purificó de la cepa BL21DE3 de *E. coli* (pgl negativo), el área del pico principal (es decir, el área del pico de la IL-18 que no tenía formación de aducto gluconoilo detectable) para la IL-18 era aproximadamente 56%. Mientras que la expresión y purificación de IL-18 en
15 células BL21 (DE3) (pgl positivo) produjo un área del pico principal de aproximadamente 88%, y no mostró formación de aducto basándose en el ensayo por HPLC de alta resolución.

Ejemplo 12

20 Se crearon dos vectores que comprendían polinucleótidos que codifican pro-IL-18 (SEQ ID NO:11), y Caspasa 5 (SEQ ID NO:12). Ambos eran vectores pET en los que se indujo la producción de polipéptido usando un promotor de T7. Un vector también comprendía un polinucleótido que codifica pgl de *P. aeruginosa* (SEQ ID NO:7) que se indujo con el mismo promotor que para pro-IL-18. La secuencia entera del vector pET que comprende pro-IL-18 y Caspasa 5 se presenta en el SEQ ID NO:13. Se presenta un mapa de restricción de este vector en la Figura 2. La secuencia entera del vector pET que comprende pro-IL-18, Caspasa 5 y pgl se presenta en el SEQ ID NO:14. Se presenta un mapa de restricción de este vector en 3. Cuando se expresó la IL-18 en células BL21 (DE3) de *E. coli* usando estos
25 vectores, la cantidad de IL-18 recuperable mejoró mucho cuando el polipéptido se coexpresó con pgl, comparado con la expresión de IL-18 sin pgl. La cantidad de IL-18 recuperable obtenida de cada vector de expresión en células BL21 (DE3) de *E. coli* se presenta en la Tabla 14.

Tabla 14: Concentración máxima de IL-18 producida en cepa "B" de *E. coli* con y sin coexpresión de pgl

Cepa*	gen pgl	Concentración máxima (g/l)
RBB057	No	4,32 (+/- 0,4)
RBB059	Si	6,78 (+/-0,1)
*Ambas cepas son cepa B de <i>E. coli</i>		

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> GARDNER, Alan R.
SWEITZER, Thomas D.
TAYLOR, Alexander H.
5 PATEL, Pramatesh
- <120> MÉTODOS PARA PREVENIR LA GLUCONOILACIÓN DE PROTEÍNAS
- <130> PU60116
- <140> Pendiente de asignar
<141> 04-03-2004
- 10 <150> 60/451,686
<151> 2003-03-04
- <160> 14
- <170> FastSEQ para versión de Windows 4.0
- 15 <210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> ESCHERIACHIA COLI
- <400> 1
agctggccat tgctcaggtc gaag
- 20 <210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> ESCHERICHIA COLI
- <400> 2
25 gtactgtccg gaatacacga cgatg
- <210> 3
<211> 413
<212> DNA
<213> ESCHERICHIA COLI
- 30 <400> 3
agctggccat tgctcaggtc gaagagatgc aggcagtttc tgccgtgctt aagggcaaat 60
acaccatgac cgggtgaagcc ttcgatccgg ttgaggtgga tatgggcccgc agtgaggaga 120
ataacatcac gcagtccggc ggcacggagt ggagcaagcg tgacaagtcc acgtatgacc 180
cgaccgacga tatcgaagcc tacgcgctga acgccagcgg tgtggtgaat atcatcgtgt 240
tcgatccgaa aggctgggcy ctgttccgtt ccttcaaagc cgtcaaggag aagctggata 300
cccgtcgtgg ctctaattcc gagctggaga cagcgggtgaa agacctgggc aaagcgggtgt 360
cctataaggg gatgtatggc gatgtggcca tcgtcgtgta ttccggacag tac 413
- <210> 4
<211> 8
<212> PRT
35 <213> HOMO SAPIENS
- <400> 4
Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys
1 5
- <210> 5
<211> 29

ES 2 369 359 T3

<212> DNA
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5
 ggcctcgagc tcggtggccc tgggtggccc

5 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas aeruginosa

10 <400> 6
 gccctcgagt ccgccactca ggggtaccaa t

<210> 7
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas aeruginosa

15 <400> 7

```

atgggaggag ttggtatggc gatttctgag ttgaagctgc cggccggcgt cggcctgcag 60
gtctggggca gcgccgccga gcaggcccgc ggcctggccg ccgaggctgc cggccggttg 120
cgctcggcgc tggccgagca gggccaggcg ctgctggtgg tgtccggtgg gcgcagtcgg 180
gtggccttcc tcgaagcctt gagcgaggag ccgctggact ggtcgcggat caccgtcagg 240
ctggccgacg agcgctgggt gccggagtcg catgccgata gcaacgccgg cctggttcgc 300
cgccacctgc tccgtggcga ggcggcgaag gcgcgcttca tcggcctcta ccagccggcg 360
gcgagcctgg aggaagcggc cgagctggcc gaccatcacc tgcacgagct gccattgccg 420
atcgacgtgc tggtcctcgg catgggcgac gacggccata ccgcctcgct gttcccgaac 480
agccctggcc tggacctggc gatggatccc caggggacgc gccgttgctt gccgatgtgg 540
gcgccgagcg tgccgcacca gcgcctgacc ctgccgcgcg ccgtgctggc ggcggcgaag 600
gtgcagctgc tggcgatcca gggccagtcc aagctggcca ccctgaacgc cgcgctggcg 660
gtcgaggacg aacggcggat gccggttcgc gccttcctcc gcgcgccgct gacgatccat 720
tggtaccct ga 732
  
```

<210> 8
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa

20 <400> 8

ES 2 369 359 T3

Met Gly Gly Val Gly Met Ala Ile Ser Glu Leu Lys Leu Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gly Leu Gln Val Trp Gly Ser Ala Ala Glu Gln Ala Arg Gly Leu
 20 25 30
 Ala Ala Glu Val Ala Gly Arg Leu Arg Ser Ala Leu Ala Glu Gln Gly
 35 40 45
 Gln Ala Leu Leu Val Val Ser Gly Gly Arg Ser Pro Val Ala Phe Leu
 50 55 60
 Glu Ala Leu Ser Glu Glu Pro Leu Asp Trp Ser Arg Ile Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Leu Ala Asp Glu Arg Trp Val Pro Glu Ser His Ala Asp Ser Asn Ala
 85 90 95
 Gly Leu Val Arg Arg His Leu Leu Arg Gly Glu Ala Ala Lys Ala Arg
 100 105 110
 Phe Ile Gly Leu Tyr Gln Pro Ala Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp His His Leu His Glu Leu Pro Leu Pro Ile Asp Val Leu
 130 135 140
 Val Leu Gly Met Gly Asp Asp Gly His Thr Ala Ser Leu Phe Pro Asn
 145 150 155 160
 Ser Pro Gly Leu Asp Leu Ala Met Asp Pro Gln Gly Thr Arg Arg Cys
 165 170 175
 Leu Pro Met Trp Ala Pro Ser Val Pro His Gln Arg Leu Thr Leu Pro
 180 185 190
 Arg Ala Val Leu Ala Ala Ala Lys Val Gln Leu Leu Ala Ile Gln Gly
 195 200 205
 Gln Ser Lys Leu Ala Thr Leu Asn Ala Ala Leu Ala Val Glu Asp Glu
 210 215 220
 Arg Arg Met Pro Val Arg Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Thr Ile His
 225 230 235 240
 Trp Tyr Pro

<210> 9

<211> 3416

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Comprende expresión de PECO-1 y Pseudomonas aeruginosa

<400> 9

ES 2 369 359 T3

gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
 gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctctgggt 120
 ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180
 tatatcaacg gtggtatata cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240
 aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300
 ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcca aagttggccc agggcttccc 360
 ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacagggtat 420
 ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatgggt 480
 gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
 acgggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
 ggcttactat gttggcactg atgaggggtg cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
 aaggetgcac cggtgcgta gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttctcgcctc 720
 actgactcgc tacgctcggg cgttcgactg cggcgagcgg aatggctta cgaacggggc 780
 ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
 agccgttttt ccataggctc cgcacctctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaatc 900

ES 2 369 359 T3

agtgggtggcg aaacccgaca ggactataaaa gataccaggc gtttccccct ggcggtctccc 960
 tcgtgcgctc tcctgttccct gcctttcggg ttaccgggtg cattccgctg ttatggccgc 1020
 gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac 1080
 tgtatgcacg aacccccctg tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 1140
 gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccaactggcag cagccactgg taattgattt 1200
 agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg 1260
 tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaaagag ttggtagctc agagaacctt 1320
 cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttttc gttttcagag caagagatta cgcgagacc 1380
 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca 1440
 atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc 1500
 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct 1560
 aacgcagtca ggcaccgtgt catatggatc ccgggtaccg tcgagctcga gctcgggtggc 1620
 cctgggtggcc cgcgatggga ggagttggta tggcgatttc tgagttgaag ctgccggccg 1680
 gcgtcggcct gcaggtctgg ggcagcgccg ccgagcaggc ccgcgccctg gccgccgagg 1740
 tcgccggccg gttgcgctcg gcgctggccg agcagggcca ggcgctgctg gtgggtgtccg 1800
 gtgggcgag tccgggtggc ttctctgaag ccttgagcga ggagccgctg gactggctgc 1860
 ggatcacctg cagcctggcc gacgagcgt ggggtgccga gtcgcatgcc gatagcaacg 1920
 ccggcctggt tcgccgccac ctgctccgtg gcgagggcgc gaaggcgcgc ttcacggcc 1980
 tctaccagcc ggcggcgagc ctggaggaag cggccgagct ggccgacat cacctgcacg 2040
 agctgccatt gccgatcgac gtgctggctc tcggcatggg cgacgacggc cataccgct 2100
 cgctgttccc gaacagccct ggcctggacc tggcgatgga tccccagggg acgcgccgtt 2160
 gcctgccgat gtgggcgccg agcgtgcgc accagcgcct gacctgccg cgcgccgtgc 2220
 tggcggcggc gaaggtgcag ctgctggcga tccagggcca gtccaagctg gccaccctga 2280
 acgccgcgct ggcggctcag gacgaacggc ggatgccggg tcgcgccttc ctccgcgcgc 2340
 cgctgacgat ccattggtac ccctgagtgg cggactcgac tagtcaacgc catgagcggc 2400
 ctcatctctt attctgagtt acaacagtcc gcaccgctgt ccggtagctc cttccgggtg 2460
 gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta 2520
 ggacaggtgc cggcagcgcc caacagtccc ccggccacgg ggctgccac catacccacg 2580
 ccgaaacaag cgccctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 2640
 ccctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgctaac cgtttttctc aggctctggg 2700
 aggcagaata aatgatcata tcgtcaatta ttacctcac ggggagagcc tgagcaaact 2760
 ggctcaggc atttgagaag cacacggctc cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtaa 2820
 accagcaata gacataagcg gctatttaac gacctgccc tgaaccgacg accgggtcga 2880
 atttgcttcc gaatttctgc cattcatccg cttattatca cttattcagg cgtagcacca 2940
 ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg ccccgccctg ccaactcatc 3000
 cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca gacggcatga 3060
 tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtgcctt gcgtataata tttgcccatg 3120
 gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata ttggccacgt ttaaatcaaa actggtgaaa 3180
 ctcaaccagg gattggctga gacgaaaaac atattctcaa taaaccctt agggaaatag 3240
 gccaggtttt caccgtaaca cgccacatct tgccaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa 3300

 tcgtcgtggt attcactcca gagcgatgaa aacgtttcag tttgctcatg gaaaacgggtg 3360
 taacaagggt gaacactatc ccatatcacc agctcaccgt ctttcattgc catacg 3416

ES 2 369 359 T3

<210> 10
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS

5 <400> 10

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1           5           10           15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
           20           25           30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
           35           40           45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
           50           55           60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
           65           70           75           80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
           85           90           95
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
           100          105          110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
           115          120          125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
           130          135          140
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
           145          150          155
    
```

<210> 11
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> HOMO SAPIENS

10

<400> 11

```

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
cttgagagca aactatcggg cattcgtaat ttaaattgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180

gggaatcgtc cactattoga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgcccgcga 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggactatt 480
cttgcattgc agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
ggcgatcgcg gcattatggt cactgtccaa aatgaagact ag 582
    
```

15 <210> 12
 <211> 849
 <212> DNA
 <213> HOMO SAPIENS

ES 2 369 359 T3

<400> 12

```
atgggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaacttt gtcctcgtga agaattcctg 60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga 120
cgcttggtc tcatcatatg caatacaaag tttgatcacc tgcctgcaag gaatggggct 180
cactatgaca tcgtggggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtggttgac 240
gaaaagaatc tcacagccag ggatatggag tcagtgtgga gggcatttgc tgccagacca 300
gagcacaagt cctctgacag cacgttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagaggga 360
atctgcggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggatgtgc tgctttatga caccatcttc 420
cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaaggaca aaccaagggt catcattgtc 480
caggcctgca gagtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
gcagtcattc cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataacgtgtc ctggagagac 660
cgcaacaagg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttccagaa atattcttgc 720
tgctgccacc taatggaaat atttcggaag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct 780
aaagcccaga tgcccacat agaacgagca accttgacaa gagatttcta cctctttcct 840
ggcaattga 849
```

<210> 13

<211> 6687

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Comprende vector pET Vector y Homo Sapien

<400> 13

```
tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacaattg ccagcgcctt agcgcctcgt cctttcgttt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
```

ES 2 369 359 T3

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttgcctt ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcctgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
 tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcgggtctgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccgggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgcgt ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
 tgggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag ccattttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaacac 1380
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtgggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgcct ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacggc 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctcgcgtta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cgggaagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcgggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgtgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580

ES 2 369 359 T3

gtgaagegat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgттаат gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggg tactggaacg 2820
 ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcagc atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc cgggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaaacgat cctcattca 3900
 gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccc 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta cegtctcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
 ccacgcgggt gggaaatgtaa ttcagctccg ccatcgcgcg ttccactttt tccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
 tctcagcgt ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgccgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccacgg ggctgcccac cataccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat cttcccacg ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgccgggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980

ES 2 369 359 T3

aattaatacag actcactata ggggaattgt gagcgggataa caattcccct ctagaccaca 5040
 ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
 tggcaatgaa atttattgac aatacgcctt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
 aatcagatta ctttggaag cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaatgacc 5220
 aggtcctatt tatcgaccaa gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact 5280
 gccgagacaa tgcgccgcga accatcttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
 gcggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga 5400
 acaagattat tagtttcaaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
 atatcatatt tttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
 ccagctatga agggctacttt cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt 5580
 taaagaaaga ggacgagcga ggcgatcgcg gcattatggt cactgtccaa aatgaagact 5640
 agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg 5700
 gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcctgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg 5760
 agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata 5820
 caaagtgtga tcacctgctt gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa 5880
 ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata 5940
 tggagtcagt gctgagggca tttgctgccg gaccagagca caagtcctct gacagcacgt 6000
 tcttggtact catgtctcat ggcacccatg agggaaatctg cggaaactgcg cataaaaaga 6060
 aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tottccagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
 tcagtctaaa ggacaaaccc aaggctcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
 gggaaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcactctg 6240
 agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
 gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
 cggaactcat cacatgcttc cagaaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
 ggaaggtaca gaaatcattt gaagttccac aggctaaagc ccagatgccc accatagaac 6480
 gagcaacctt gacaagagat ttctacctct ttcctggcaa ttgactcgag caccaccacc 6540
 accaccactg agatccggct gctaacaag cccgaaagga agctgagttg gctgctgccg 6600
 ccgctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 6660
 tgctgaaagg aggaactata tccggbt 6687

<210> 14

<211> 7454

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<214> Comprende vector pET Vector y Homo Sapien, Pseudomonas Aeruginosa

<400> 14

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcgt cctttcgtt tottcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

ES 2 369 359 T3

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
 tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcgggtctgag attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
 tggtagagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
 cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgacca aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttcactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtctgtctt taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtegatatt tgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcagaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580

ES 2 369 359 T3

gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgттаат gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgtcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccgtt tactggaacg 2820
 ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgacccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcg gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctcc cgccgaaaat gaccagagc gctgcggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcag ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggcc gctaacagcg cgatttctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgce cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcttc taccatcgac accaccagc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgc agttgttgtg 4440
 ccacgcgggt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 ctccggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
 tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgccgccg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980

ES 2 369 359 T3

aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaagtacc 5220
aggctctatt tatcgaccaa gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact 5280
gccgagacaa tgcgccgca accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
gcggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga 5400
acaagattat tagtttcaaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga agggctacttt cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt 5580
taaagaaaga ggacgagcta ggcgatcgca gcattatggt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcttgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggctctcacc atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcagt gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtcctct gacagcacgt 6000
tcttggtact catgtctcat ggcacctag agggaatctg cggaaactgc cataaaaaaga 6060
aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tcttocagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggacaaacce aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
ggaaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaaactcat cacatgcttc cagaaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
ggaaggtaaa gaaatcattt gaagtccac aggctaaagc ccagatgcc accatagaac 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctt ttcttgcaa ttgactcgag ctcggtggcc 6540
ctggtggccc gcgatgggag gagttggtat ggcgatttct gagttgaagc tgccggccgg 6600
cgtcggcctg caggtctggg gcagcgcgc cgagcaggcc cgccgctgg ccgccagagt 6660
cgccggccgg ttgcgctcgg cgtgcccga gcagggccag gcgctgctgg tgggtgccgg 6720
tgccgcagct ccggtggcct tctcgaagc cttgagcgag gagccgctgg actggtcgcg 6780
gatcacagtc agcctggccg acgagcgtg ggtgccggag tcgcatgcc atagcaacgc 6840
cggcctgggt cgccgccacc tgctcctgg cgaggcggcg aaggcgcct tcatcgccct 6900
ctaccagccg gcggcgagcc tggaggaagc ggccgagctg gccgaccat acctgcacga 6960
gctgccattg ccgatcgac tgctggtcct cggcatgggc gacgacggcc ataccgctc 7020
gctgttcccg aacagccctg gcctggacct ggcgatggat cccagggga cgcgccgttg 7080
cctgccgatg tgggcgccga gcgtgccga ccagcgcctg accctgccgc gcgccgtgct 7140
ggcggcggcg aaggtgcagc tgctggcgat ccagggccag tccaagctgg ccaccctgaa 7200
cgccgcgctg gcggtcgagg acgaacggcg gatgccggtt cgcgccttcc tccgcgcgcc 7260
gctgacgac cattggtacc cctgagtggc ggactcgagc accaccacca ccaccactga 7320
gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 7380
taactagcat aacccttgg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga 7440
ggaactatat ccgg 7454

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados en una cepa B de *E.coli*, que comprende introducir DNA en la *E.coli*, donde el DNA codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 95% respecto al SEQ ID NO:8.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1, en el que dichos polipéptidos comprenden una interleuquina humana.
3. Un método para producir una interleuquina humana que comprende expresar conjuntamente dicha interleuquina humana en una cepa B de *E.coli* con un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.
4. Un método según la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que la interleuquina humana es IL-18.
- 10 5. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con respecto a SEQ ID NO:7.
6. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:7.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el DNA se transforma en el DNA genómico de la *E.coli*.
- 15 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa B de *E.coli* es BL21.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido es un polipéptido expresado heterológamente.

pECO-1-pgl-2-13

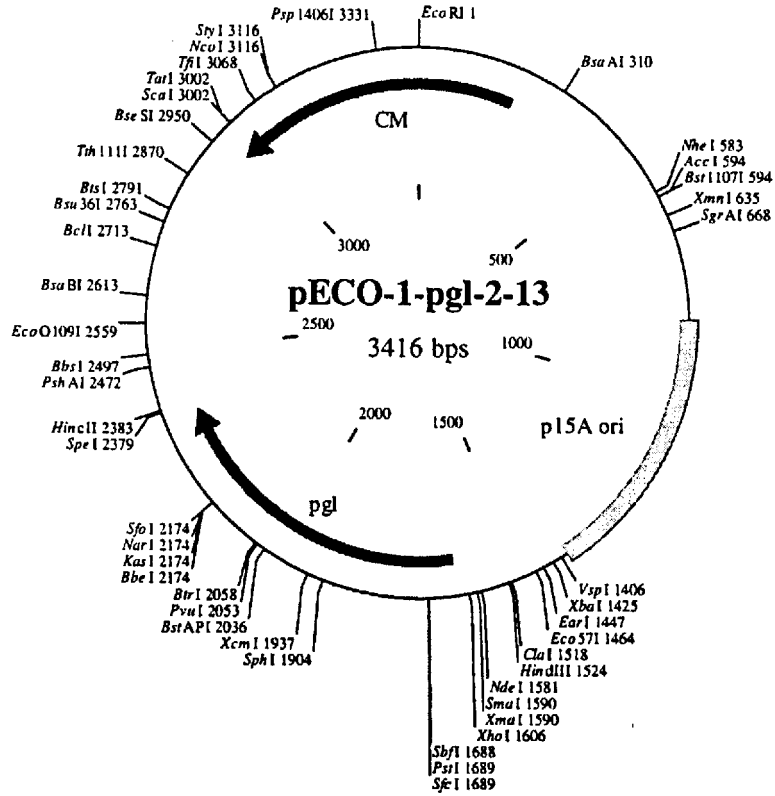


Figura 1

ES 2 369 359 T3

SEQ ID NO:9

DNA

pECO-1pglc12-13

1 GAATCCCGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG GATAAACTT
 61 GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT
 121 ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA
 181 TATATCAACG GTGGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA
 241 AAATCTCGAT AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTTCATTAT GGTGAAAGTT
 301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC AGGGCTTCCC
 361 GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT
 421 TTATTCGGCG CAAAGTGCCT CGGGTGATGC TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT
 481 GTTTTGGAGG TGCTCCAGTG GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG
 541 ACGGGTGGT GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT
 601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTCATGTGG CAGGAGAAAA
 661 AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA TATATTCCGC TTCTCGCTC
 721 ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG CCGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC
 781 GGAGATTTCC TGAAGATGC CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCCGGGCAA
 841 AGCCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC
 901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GCGGCTCCC
 961 TCGTGCCTC TCCTGTTCCCT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT CATTCCGCTG TTATGGCCGC
 1021 GTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC
 1081 TGTATGCACG AACCCCCCGT TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
 1141 GAGTCCAACC CGGAAAGACA TGCAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT
 1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA CAAGTTTTGG
 1261 TGAATGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG TTGGTAGCTC AGAGAACCTT
 1321 CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC
 1381 AAAACGATCT CAAGAAGATC ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAGTGCA
 1441 ATTTATCTCT TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC
 1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG TTAATTTGCT
 1561 AACGCAGTCA GGCACCGTGT CATATGGATC CCGGTACCG TCGAGCTCGA GCTCGGTGGC
 1621 CCTGGTGGCC CGCGATGGGA GGAGTTGGTA TGGCGATTC TGAGTTGAAG CTGCCGGCCG
 1681 GCGTCGGCCT GCAGGTCTGG GGCAGCGCCG CCGAGCAGGC CCGCGGCCTG GCCCGGAGG
 1741 TCGCCGGCCG GTTGCCTCG CCGCTGGCCG AGCAGGGCCA GGCGCTGCTG GTGGTGTCCG
 1801 GTGGGCGCAG TCCGGTGGCC TTCTCGAAG CCTTGAGCGA GGAGCCGCTG GACTGGTCCG
 1861 GGATCACCGT CAGCCTGGCC GACGAGCGCT GGGTGCCGGA GTCGCATGCC GATAGCAACG
 1921 CCGCCTGGT TCGCCGCCAC CTGCTCCGTG GCGAGCGGC GAAGGCGCGC TTCATCGGCC
 1981 TCTACCAGCC GGCGGCGAGC CTGGAGGAAG CGGCCGAGCT GGCCGACCAT CACCTGCACG
 2041 AGCTGCCATT GCCGATCGAC GTGCTGGTCC TCGGCATGGG CGACGACGGC CATAACCGCT
 2101 CGCTGTTCCC GAACAGCCCT GGCTGGACC TGGCGATGGA TCCCAGGGG ACGCGCCGTT
 2161 GCCTGCCGAT GTGGGCGCCG AGCGTGCCGC ACCAGCGCCT GACCCTGCCG CGCGCCGTGC
 2221 TGGCGCGGC GAAGGTGCAG CTGCTGGCGA TCCAGGGCCA GTCCAAGCTG GCCACCCTGA
 2281 ACGCCGCGCT GCGGTTCGAG GACGAACGGC GGATGCCGGT TCGCGCCTTC CTCCGCGCGC

ES 2 369 359 T3

2341 CGCTGACGAT CCATTGGTAC CCCTGAGTGG CGGACTCGAC TAGTCAACGC CATGAGCGGC
2401 CTCATTTCTT ATTCTGAGTT ACAACAGTCC GCACCGCTGT CCGGTAGCTC CTTCCGGTGG
2461 GCGCGGGGCA TGACTIONCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCAACTCGTA
2521 GGACAGGTGC CGGCAGCGCC CAACAGTCCC CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATAACCACG
2581 CCGAAACAAG CGCCCTGCAC CATTATGTTT CCGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA
2641 CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCGCTAAC CGTTTTTATC AGGCTCTGGG
2701 AGGCAGAATA AATGATCATA TCGTCAATTA TTACCTCCAC GGGGAGAGCC TGAGCAAAC
2761 GGCCTCAGGC ATTTGAGAAG CACACGGTCA CACTGCTTCC GGTAGTCAAT AAACCGGTAA
2821 ACCAGCAATA GACATAAGCG GCTATTTAAC GACCCTGCCC TGAACCGACG ACCGGGTCTGA
2881 ATTTGCTTTC GAATTTCTGC CATTATCCG CTTATTATCA CTTATTCAGG CGTAGCACCA
2941 GGCCTTTAAG GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAATTACG CCCC GCCCTG CCACTCATCG
3001 CAGTACTGTT GTAATTCATT AAGCATTCTG CCGACATGGA AGCCATCACA GACGGCATGA
3061 TGAACCTGAA TCGCCAGCGG CATCAGCACC TTGTGCGCTT GCGTATAATA TTTGCCCATG
3121 GTGAAAACGG GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCCACGT TTAAATCAAA ACTGGTGAAA
3181 CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCTTT AGGGAAATAG
3241 GCCAGTTTTT CACCGTAACA CGCCACATCT TGCGAATATA TGTGTAGAAA CTGCCGGAAA
3301 TCGTCGTGGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG
3361 TAACAAGGGT GAACACTATC CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCATTGC CATAACG

Figura 2

pET28ProIL18Casp5

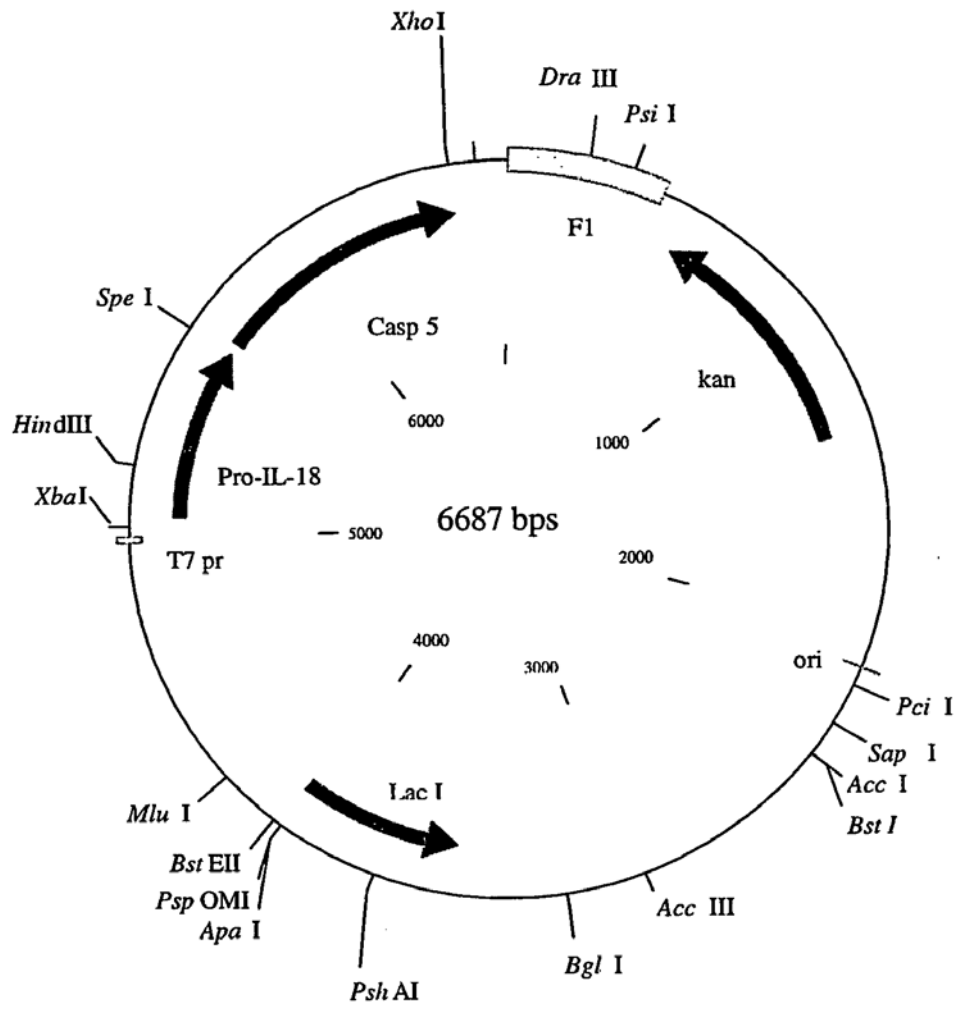


Figura 3

ES 2 369 359 T3

SEQ ID NO:13

DNA

pET28ProIL18Casp5

1 TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGGC
 61 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
 121 CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
 181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
 241 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
 301 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATCT CCGTCTATTC
 361 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTC GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA
 421 AAAAAAATTT AACCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTAG GTGGCACTTT
 481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTT TAAATACATT CAAATATGTA
 541 TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
 601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
 661 ACTCACCGAG GCAGTTCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCGGACTC
 721 GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
 781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
 841 AGACTTGTTT AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
 901 CGTTATTTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAGGAC
 961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
 1021 TTTACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG
 1081 TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
 1141 TAAATTCGGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTG GCAACGCTAC
 1201 CTTTGCCATG TTTAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
 1261 TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
 1321 TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
 1381 CCCTTGATAT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
 1441 CGTGAGTTTT CGTTCCTACT AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
 1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
 1561 GTGGTTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
 1621 AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCCTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
 1681 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC
 1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
 1801 CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
 1861 ACCGAACGTA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
 1921 AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
 1981 CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
 2041 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
 2101 GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
 2161 TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
 2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATCGCG
 2281 TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA

ES 2 369 359 T3

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACTACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
 2401 GGTCATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
 2461 GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTAGAG
 2521 GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
 2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCCGTGTT ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTTCTCCAG
 2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCTGTTT
 2701 GGTCACCTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGGATT TCTGTTTATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
 2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
 2821 TTGTGAGGGT AAACAACCTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
 2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
 2941 TCGCATGCAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
 3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTCATGT TGTGCTCAG GTCGCAGACG TTTTGCAGCA
 3061 GCAGTCGCTT CACGTTTCGCT CGCGTATCGG TGATTCATTC TGCTAACCAG TAAGGCAACC
 3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
 3181 CATGCCGGCG ATAATGGCCT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
 3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCGC
 3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCC TCGCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCTTAC
 3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGACG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
 3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTTCGAGATC CCGGTGCCTA
 3481 ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTC AGTCGGGAAA
 3541 CCTGTCTGTC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
 3601 TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
 3661 CCGCCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
 3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCGT
 3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTG
 3841 CGCCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGAACGATG CCCTCATTCA
 3901 GCATTTGCAT GTTTTGTTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCCTTCC CGTTCCGCTA
 3961 TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
 4021 AGACAGAACT TAATGGGCC CTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
 4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
 4141 GGTCAGAGAC ATCAAGAAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
 4201 CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
 4261 TGTGCACCGC CGCTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCACGC
 4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GGCGCGTGCA
 4381 GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
 4441 CCACGCGGTT GGAATGTAA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCAGTTT
 4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGTTTACCA CGCGGGAAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
 4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
 4621 CTTCCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCGGGGA
 4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCAGTAG TAGGTTGAGG
 4741 CCGTTGAGCA CCGCCCGCCG AAGGAATGGT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
 4801 CCGCCACCGG GGCTGCCAC CATAACCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

ES 2 369 359 T3

4861 CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
 4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
 4981 AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
 5041 CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
 5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
 5161 AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTGCTAAT TTAAATGACC
 5221 AGGTCCTATT TATCGACCAA GGAATCGTC CACTATTCGA GGACATGACA GACAGTGACT
 5281 GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
 5341 GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
 5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
 5461 .ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
 5521 CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAAC TTATTT
 5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
 5641 AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
 5701 GCATACTCAA ACTTTGTCCT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
 5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCC T GGCTCTCATC ATATGCAATA
 5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
 5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
 5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCCTCT GACAGCACGT
 6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCACTCTAG AGGGAATCTG CGGAAGTGGC CATAAAAAAGA
 6061 AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
 6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
 6181 GGGAACTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
 6241 AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
 6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
 6361 CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
 6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
 6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTGCGCAA TTGACTCGAG CACCACCACC
 6541 ACCACCACTG AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA
 6601 CCGCTGAGCA ATAAGTAGCA TAACCCCTTG GGGCCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT
 6661 TGCTGAAAGG AGGAACTATA TCCGGBT

Figura 4

pET28proIL18casp5+pgl

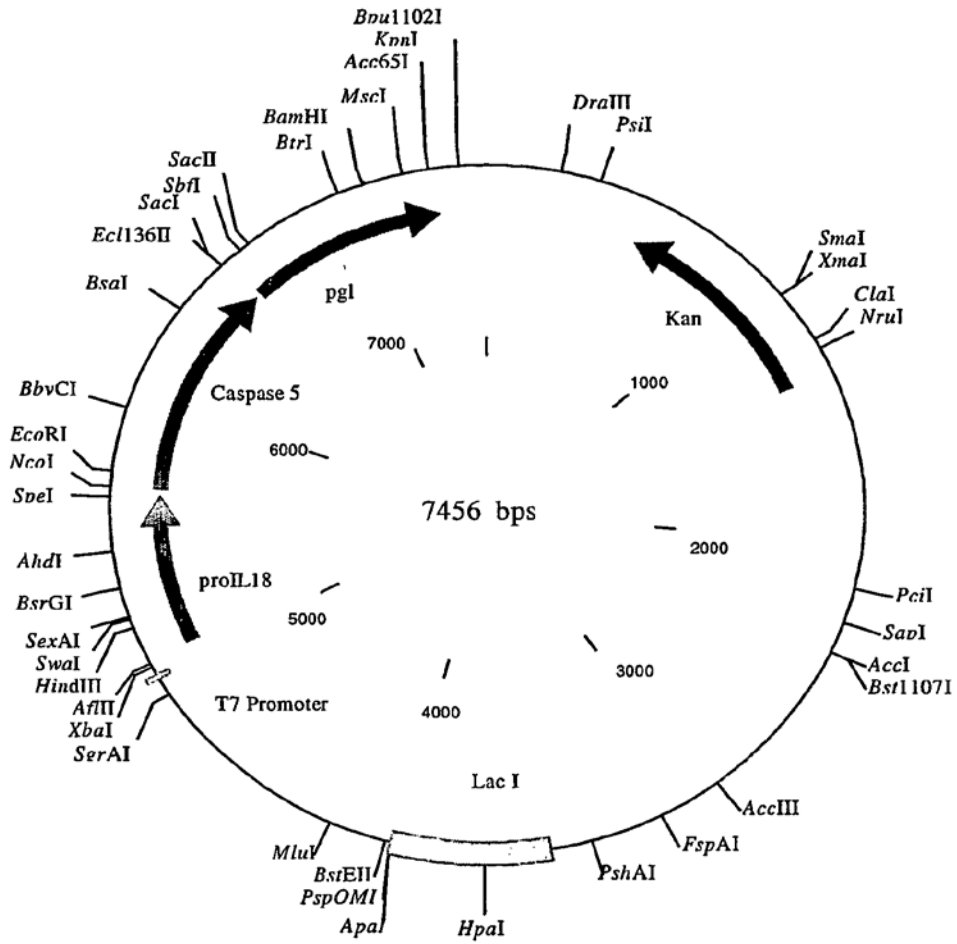


Figura 5

ES 2 369 359 T3

SEQ ID NO:14

DNA

pET28proIL18casp5+pgl

```

1   TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
61  CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
121 CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
241 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
301 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATCT CGGTCTATTC
361 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTAAAAATG AGCTGATTTA
421 AAAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTT CAG GTGGCACTTT
481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTT TAAATACATT CAAATATGTA
541 TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
661 ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCCGACTC
721 GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
841 AGACTTGTTT AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
901 CGTTATTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAAAGGAC
961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021 TTTACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTCCCG GGGATCGCAG
1081 TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141 TAAATTCCGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTG GCAACGCTAC
1201 CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261 TCGCACCTGA TTGCCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321 TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381 CCCTTGATTT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441 CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
1561 GTGGTTTGTG TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
1621 AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCCTGCT CTGCTAATCC TGTACCAGT GGCTGCTGCC
1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801 CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGAGCG AACGACCTAC
1861 ACCGAACTGA GATACCTACA GCCTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921 AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981 CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
2041 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
2101 GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTCTTT TCCTGCGTTA
2161 TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281 TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA

```

ES 2 369 359 T3

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
 2401 GGTCATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
 2461 GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTGAGAG
 2521 GTTTTACCCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
 2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCCTGTTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTTCTCCAG
 2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCTGTTT
 2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGGATT TCTGTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
 2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
 2821 TTGTGAGGGT AAACAACCTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
 2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCTA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
 2941 TCGGATGCAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
 3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTCATGT TGTGCTCAG GTCGCAGACG TTTTGCAGCA
 3061 GCAGTCGCTT CACGTTCGCT CCGTATCGG TGATTCATTC TGCTAACCAG TAAGGCAACC
 3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
 3181 CATGCCGGCG ATAATGGCCT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
 3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCGC
 3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCCT CGCCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCTTAC
 3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGACG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
 3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTGAGATC CCGGTGCCTA
 3481 ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTC AGTCGGGAAA
 3541 CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
 3601 TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
 3661 CCGCCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
 3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCGT
 3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTG
 3841 CGCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGAACGATG CCCTCATTCA
 3901 GCATTTGCAT GGTTTGTTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCCTTCC CGTTCGCTA
 3961 TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
 4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
 4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
 4141 GGTGAGAGAC ATCAAGAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
 4201 CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
 4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCACGC
 4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GGCAGCTGCA
 4381 GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
 4441 CCACGCGGTT GGGAAATGTAA TTCAGTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGGTTT
 4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTCACCA CGCGGAAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
 4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
 4621 CTTCCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCGGGGA
 4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CGACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCCAGTAG TAGGTTGAGG
 4741 CCGTTGAGCA CCGCCGCGC AAGGAATGGT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
 4801 CCGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

4861 CGAGCCCGAT CTTCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
 4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
 4981 AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
 5041 CCTPAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
 5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
 5161 AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC
 5221 AGGTCCATT TATCGACCAA GGAATCGTC CACTATTCGA GGACATGACA GACAGTGACT
 5281 GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
 5341 GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
 5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
 5461 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
 5521 CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTATTT
 5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
 5641 AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
 5701 GCATACTCAA ACTTTGTCCT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
 5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCCT GGCTCTCATC ATATGCAATA
 5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
 5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
 5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCCTCT GACAGCACGT
 6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CGGAACTGCG CATAAAAAAG
 6061 AAAAACCAGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
 6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
 6181 GGGAACTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
 6241 AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
 6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
 6361 CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
 6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
 6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTGGCAA TTGACTCGAG CTCGGTGGCC
 6541 CTGGTGGCCC GCGATGGGAG GAGTTGGTAT GGGGATTTCT GAGTTGAAGC TGCCGGCCGG
 6601 CGTCGGCCTG CAGGTCTGGG GCAGCGCCGC CGAGCAGGCC CGCGGCCTGG CCGCCGAGGT
 6661 CGCCGGCCGG TTGCGCTCGG CGCTGGCCGA GCAGGGCCAG GCGCTGCTGG TGGTGTCCGG
 6721 TGGGCGCAGT CCGGTGGCCT TCCTCGAAGC CTTGAGCGAG GAGCCGCTGG ACTGGTCCGG
 6781 GATCACAGTC AGCCTGGCCG ACGAGCGCTG GGTGCCGGAG TCGCATGCCG ATAGCAACGC
 6841 CGGCCTGGTT CGCCGCCACC TGCTCCGTGG CGAGGCGGCG AAGGCGCGCT TCATCGGCCT
 6901 CTACCAGCCG GCGGCGAGCC TGGAGGAAGC GGCCGAGCTG GCCGACCATC ACCTGCACGA
 6961 GCTGCCATTG CCGATCGACG TGCTGGTCTT CGGCATGGGC GACGACGGCC ATACCGCCTC
 7021 GCTGTTCCCG AACAGCCCTG GCCTGGACCT GGCATGGAT CCCCAGGGGA CGCGCCGTTG
 7081 CCTGCCGATG TGGGCGCCGA GCGTGCCGCA CCAGCGCCTG ACCCTGCCGC GCGCCGTGCT
 7141 GGCGGCGGCG AAGGTGCAGC TGCTGGCGAT CCAGGGCCAG TCCAAGCTGG CCACCCTGAA
 7201 CGCCGCGCTG GCGGTGCGAG ACGAACGGCG GATGCCGGTT CGCGCCTTCC TCCGCGCGCC
 7261 GCTGACGATC CATTGGTACC CCTGAGTGGC GGACTCGAGC ACCACCACCA CCACCCTGA
 7321 GATCCGGCTG CTAACAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA

ES 2 369 359 T3

7381 TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA
7441 GGAACTATAT CCGG

Figura 6

SEQ ID NO:7

DNA

PGL de *Pseudomonas aeruginosa*

ATG GGA GGA GTT GGT ATG GCG ATT TCT GAG TTG AAG CTG CCG GCC GGC
 GTC GGC CTG CAG GTC TGG GGC AGC GCC GCC GAG CAG GCC CGC GGC CTG
 GCC GCC GAG GTC GCC GGC CGG TTG CGC TCG GCG CTG GCC GAG CAG GGC
 CAG GCG CTG CTG GTG GTG TCC GGT GGG CGC AGT CCG GTG GCC TTC CTC
 GAA GCC TTG AGC GAG GAG CCG CTG GAC TGG TCG CGG ATC ACC GTC AGC
 CTG GCC GAC GAG CGC TGG GTG CCG GAG TCG CAT GCC GAT AGC AAC GCC
 GGC CTG GTT CGC CGC CAC CTG CTC CGT GGC GAG GCG GCG AAG GCG CGC
 TTC ATC GGC CTC TAC CAG CCG GCG GCG AGC CTG GAG GAA GCG GCC GAG
 CTG GCC GAC CAT CAC CTG CAC GAG CTG CCA TTG CCG ATC GAC GTG CTG
 GTC CTC GGC ATG GGC GAC GAC GGC CAT ACC GCC TCG CTG TTC CCG AAC
 AGC CCT GGC CTG GAC CTG GCG ATG GAT CCC CAG GGG ACG CGC CGT TGC
 CTG CCG ATG TGG GCG CCG AGC GTG CCG CAC CAG CGC CTG ACC CTG CCG
 CGC GCC GTG CTG GCG GCG GCG AAG GTG CAG CTG CTG GCG ATC CAG GGC
 CAG TCC AAG CTG GCC ACC CTG AAC GCC GCG CTG GCG GTC GAG GAC GAA
 CGG CGG ATG CCG GTT CGC GCC TTC CTC CGC GCG CCG CTG ACG ATC CAT
 TGG TAC CCC TGA

Figura 7

SEQ ID NO:8
aminoácidos
PGL de *Pseudomonas aeruginosa*

MGGVGMASELKLPAQVGLQVWGSAAEQARGLAAEVAGRRLRSALAEQGQALLVVS GGRSPVAFLEA
LSEEPDWSRITVSLADERWVPESHADSNAGLVRRHLLRGEAAKARFIGLYQPAASLEEEAELADH
HLHELPLPIDVLVLGMGDDGHTASLFPNSPGLDLAMPQGTTRRCLPMWAPSVPHQRLTLPRAVLAA
AKVQLLAIQGQSKLATLNAALAVEDERRMPVRAFLRAPLTIHWYP

Figura 8