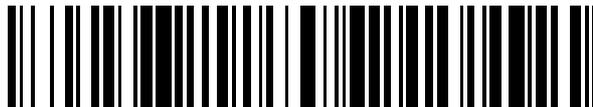


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 883**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 15/72** (2006.01)

**C12N 15/78** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2007 E 07712658 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 1984506**

54 Título: **Sistema de expresión**

30 Prioridad:

**03.02.2006 GB 0602173**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.01.2014**

73 Titular/es:

**FUJIFILM DIOSYNTH BIOTECHNOLOGIES UK LIMITED (100.0%)**

**Belasis Avenue  
Billingham TS23 1LH, GB**

72 Inventor/es:

**HODGSON, IAN JOHN;  
LENNON, CHRISTOPHER DAVID JOHN y  
KARA, BUHPENDRA VALLABH**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 436 883 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

Sistema de expresión

5 La presente invención se refiere a un sistema de expresión adecuado para la expresión microbiana de polipéptidos recombinantes.

10 Se conocen sistemas de expresión de proteínas basados en secuencias de operador palindrómicas perfectas basadas en T7 a partir de la patente US 6.537.779. Los sistemas basados en T7 presentan inconvenientes porque el funcionamiento del sistema de T7 requiere polimerasa de fago que se proporciona comúnmente insertando un profago  $\lambda$ DE3 que expresa la polimerasa de fago requerida en la cepa huésped de *Escherichia coli* para crear cepas huésped lisogénicas. La polimerasa de fago también puede suministrarse a la célula mediante infección con un fago de transducción  $\lambda$  especializado que porta el gen para la polimerasa de fago (por ejemplo ARN polimerasa de T7). El profago  $\lambda$ DE3 carece de los elementos genéticos requeridos para la escisión del profago para formar partículas de fago líticas. Sin embargo, se ha mostrado que cepas huésped lisogénicas de  $\lambda$ DE3 liberan partículas de fago y por tanto provocan infecciones no deseadas en plantas de fermentación. De hecho, no se permite el uso de cepas de  $\lambda$ DE3 a determinados operadores de plantas de fermentación.

20 La expresión de la proteína heteróloga antes de la inducción no es deseable porque algunas proteínas heterólogas tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento de la célula huésped y la estabilidad del plásmido lo que reduce la productividad global. Para evitar esto, los sistemas de expresión basados en T7 controlan generalmente la expresión de proteínas heterólogas en dos niveles. En primer lugar, se requiere la inducción de la expresión del gen de ARN polimerasa de T7 para producir ARN polimerasa de T7 para impulsar la expresión a partir del promotor de T7. En segundo lugar, también se necesita inducir el propio promotor de T7. Esto aumenta la complejidad del funcionamiento de los sistemas de expresión basados en T7.

30 Existe un gran número de sistemas de expresión de proteínas heterólogas con diferentes modos de control e inducción, haciendo que la selección y optimización del sistema de expresión/procedimiento de fermentación para proteínas de interés sea un procedimiento ampliamente empírico. Esto requiere mucho tiempo y no se desea. Por tanto, hay una necesidad de sistemas que puedan proporcionar un control mejorado de la expresión y niveles mejorados de expresión de proteínas sin el uso de polimerasa de fago ni cepas huésped lisogénicas. También hay una necesidad de sistemas que puedan proporcionar una expresión heteróloga inducible en células procariontas, así como en células eucariotas tales como células de mamíferos y levaduras.

35 Según la presente invención, se proporciona un sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en secuencias de operador palindrómicas perfectas para la expresión de proteínas en células procariontas que comprende:

40 a) un promotor; y

b) dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor;

45 caracterizado porque el promotor no es de T7.

50 Promotores que pueden emplearse en el sistema de expresión de la presente invención son comúnmente sistemas de promotor basados en ARN polimerasa de huésped, y preferiblemente sistemas de promotor basados en ARN polimerasa de *E. coli*. Los ejemplos de promotores que pueden emplearse incluyen T7A1, T7A2, T7A3,  $\lambda$ pL,  $\lambda$ pR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA y rrnB.

55 Las secuencias de operador que pueden emplearse en el sistema de expresión según la presente invención incluyen lac, gal, deo y gln. En muchas realizaciones preferidas, se emplean dos secuencias de operador palindrómicas perfectas. Cuando se emplean dos sistemas de operador, las secuencias de operador están preferiblemente separadas para maximizar el control del promotor. En muchas realizaciones, la separación es de desde 85 hasta 150 pares de bases, preferiblemente desde 90 hasta 126 pares de bases y lo más preferiblemente de 91 ó 92 pares de bases. En determinadas realizaciones, una secuencia de operador se solapa con el punto de inicio transcripcional.

60 Se reconocerá que el sistema de operador se emplea comúnmente con una secuencia represora apropiada. Las secuencias represoras producen proteína represora, por ejemplo la secuencia génica de lacI cuando se usan operadores de lac. También pueden usarse otras secuencias represoras de lac, por ejemplo puede usarse la secuencia lacI<sup>Q</sup> para aumentar el nivel de la proteína represora de lac. La secuencia represora también puede proporcionarse mediante el genoma de célula huésped o mediante el uso de un plásmido compatible adicional.

65

El sistema de expresión puede estar integrado en el genoma de célula huésped, pero está comprendido preferiblemente dentro de un elemento extracromosómico tal como un plásmido. Alternativamente, el sistema de expresión puede estar incorporado en vectores de fago o virales y éstos usarse para suministrar el sistema de expresión en el sistema de célula huésped. Pueden ensamblarse plásmidos o vectores de expresión mediante métodos conocidos en la técnica. El plásmido también comprende normalmente uno o más de los siguientes: un marcador seleccionable, por ejemplo una secuencia que confiere resistencia a antibióticos, una secuencia de estabilidad cer y un casete de expresión. El sistema de expresión también incorpora una secuencia señal si se requiere secreción de la proteína deseada.

La expresión puede inducirse mediante la adición de un inductor tal como isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), análogos de IPTG tal como isobutil-C-galactósido (IBCG), lactosa o melibiosa. Pueden usarse otros inductores y se describen más completamente en otra parte (por ejemplo véase *The Operon*, eds Miller and Renznikoff (1978)). Pueden usarse inductores individualmente o en combinación. La construcción de plásmidos o vectores de expresión apropiados resultará evidente para el científico habitual en la técnica.

El sistema de expresión de la presente invención se emplea para expresar proteínas recombinantes en células huésped procariotas, y especialmente en microorganismos. Tal como se usa en el presente documento, "proteínas" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente 10 aminoácidos. Los ejemplos de células procariotas incluyen células bacterianas, por ejemplo células bacterianas gram-negativas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marsescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, y células bacterianas gram-positivas incluyendo *Bacillus subtilis*.

Células huésped preferidas son bacterias, particularmente enterobacteriáceas, preferiblemente *E. coli*, y especialmente cepas B o K12 de la misma.

El sistema de expresión de la presente invención se emplea comúnmente en forma de un plásmido, y plásmidos que comprenden un promotor y dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor, en el que los promotor no es de T7, forman otro aspecto de la presente invención. Los plásmidos pueden ser plásmidos de replicación autónoma o plásmidos de integración.

El sistema de expresión de la presente invención se emplea para la fabricación de proteínas recombinantes, mediante el cultivo de células recombinantes. Para la expresión de proteínas recombinantes, se reconocerá que el promotor y la secuencia de operador están operativamente unidos a ADN que codifica para una proteína recombinante que va a expresarse.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para la producción de una proteína recombinante en una célula procariota que comprende expresar un sistema de expresión que comprende

a) un promotor;

b) dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas; y

c) un casete de expresión para una proteína recombinante, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor;

caracterizado porque el promotor no es de T7.

Si se desea, pueden estar presentes uno o más promotores y casetes de expresión, que pueden ser los mismos o diferentes. Las secuencias de operador empleadas pueden ser las mismas o diferentes.

Becker *et al.* dan a conocer un sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en secuencias de operador palindrómicas que comprende: a) un promotor (promotor *lac UV*), y b) dos secuencias de operador (una secuencia de operador palindrómica perfecta 5'-AATTGTGAGC/GCTCACAATT-3'; y una secuencia de operador de O<sub>2</sub> 5'-AAATGTGAGC/GAGTAACAACC-3'), estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor; caracterizado porque el promotor no es de T7 (J. Mol. Biology 349, 716-730, 2005). Becker *et al.* dan a conocer datos referentes a la represión de la expresión basal y también el efecto de formación de bucles en expresión inducida. Aunque en la figura 4 se presentan datos sobre razones de represión y actividad de indicador normalizada para diversas combinaciones de separación de operadores, estos datos no muestran las cantidades reales de indicador producido. En la tabla 1 se presentan datos clave sobre la expresión de proteínas para vector que contiene O<sub>sym</sub>. Aunque el vector que contiene O<sub>sym</sub> tiene el nivel de expresión basal, no inducido, más bajo, y de hecho la razón de represión más alta, el nivel real de producción de proteína inducida logrado es en realidad muy bajo, y de hecho mucho más bajo que el logrado con los operadores O<sub>2</sub> y O<sub>3</sub> nativos.

El sistema de expresión se expresa mediante métodos bien conocidos en la técnica para las células empleadas. Los métodos de expresión preferidos incluyen cultivar las células recombinantes en medio de crecimiento, especialmente mediante fermentación, y luego recuperar la proteína expresada. El término "medio de crecimiento" se refiere a un medio de nutrientes usado para hacer crecer las células recombinantes. En muchas realizaciones, se emplea una disolución de nutrientes. En la técnica se conocen bien medios de crecimiento adecuados para células recombinantes dadas.

La presente invención se ilustra sin limitación mediante los siguientes ejemplos.

10 1. Generación de series de vectores pAVE

Vectores pAVE011, pAVE012 y pAVE013

15 El vector de partida para la generación de pAVE011 fue pZT7#2.0, preparado tal como se describe en el documento US 6.537.779. pZT7#2.0 tiene una estructura principal de vector pAT153, secuencia de estabilidad cer, tet A/R, una secuencia de operador lac nativa individual en el sentido de 5' del gen de interés y un terminador de la transcripción de T4 en el sentido de 5'. Se clonaron un promotor T7A3 y operadores lac palindrómicos perfectos dobles en este plásmido usando ligadores oligonucleotídicos sintéticos por medio de los sitios de enzimas de restricción Nco I, EcoR I y Xba I.

20 Se preparó el ligador 12.1 hibridando los oligonucleótidos 1 y 2.1:

Oligonucleótido 1 (SEQ ID NO 1)

25 5'CATGTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCAAGAACAATCCTGCACG

Oligonucleótido 2.1 (SEQ ID NO 2)

30 5'AATTCGTGCAGGATTGTTCTTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCA

Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Nco I/EcoR I. Se realizó un examen inicial de transformantes mediante digestión de restricción usando Nco I. Se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE012.

35 Entonces se clonó el casete de promotor T7A3 en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 3 y 4:

Oligonucleótido 3 (SEQ ID NO 3)

40 5'AATTCAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAATT  
GTGAGCGCTCACAATCCCA

Oligonucleótido 4 (SEQ ID NO 4)

45 5'CTGGTGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCCTCGTGCCGT  
GTTTGCTTCGTGTTGTGGCCGTTTTGTTG

Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE011.

50 Se clonó el gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE013. En la figura 11 se presenta un mapa de plásmido para pAVE013. Esto muestra la disposición de operadores y promotor, y los sitios de enzimas de restricción usados en la construcción. Los operadores son ambos operadores lac palindrómicos perfectos. RBS es el sitio de unión al ribosoma El vector incluye una estructura principal de vector pAT153, una secuencia de estabilidad cer, un gen de resistencia a tetraciclina inducible (tet A/R), y un terminador de la transcripción de T4 en el sentido de 5'.

Vectores pAVE038 y pAVE041

60 El vector de partida para la generación de pAVE038 fue pZT7#2.0, preparado tal como se describe en el documento US 6.537.779. Se clonaron un promotor tac/T7A1 híbrido y un operador lac nativo individual en este plásmido usando un ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

Se preparó ligador 1112 hibridando los oligonucleótidos 11 y 12

Oligonucleótido 11 (SEQ ID NO 5)

5 **5'AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGGATACTGTGTGGAATT  
GTGAGCGGATAACAATCCCCA**

Oligonucleótido 12 (SEQ ID NO 6)

10 **5'CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAGTATCCGAGCC  
GATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTAGAA**

Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial de transformantes mediante digestión de restricción usando Nco I. Se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE038.

15 Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar plásmido pAVE041.

20 Vector pAVE028 y pAVE030

El vector de partida para la generación de pAVE028 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor T7A3 en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 5 y 6.

25 Oligonucleótido 5 (SEQ ID NO 9)

**5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT  
TGTGAGCGCTCACAATCCCCA**

Oligonucleótido 6 (SEQ ID NO 10)

30 **5'CTGGTGGGGGGTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCCTCGTGCCGT  
GTTTGCTTCGTGTTGTGCGCCGTTTTGTTTCG**

35 Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE028.

Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE030.

40 Vectores pAVE043 y pAVE044

El vector de partida para la generación de pAVE043 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor tac en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 17 y 18:

45 Oligonucleótido 17 (SEQ ID NO 37)

**5'AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTG  
TGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCCA**

Oligonucleótido 18 (SEQ ID NO 38)

50 **5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCG  
ATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTAGAA**

55 Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE043.

Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE044.

Vectores pAVE034 y pAVE035

5 El vector de partida para la generación de pAVE034 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor  $\lambda$ pL en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 9 y 10:

Oligonucleótido 9 (SEQ ID NO 39)

**5'AATTCATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACT  
GAGCGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

10

Oligonucleótido 10 (SEQ ID NO 40)

**5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATT  
TATGTCAACACCGCCAGAGATG**

15 Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE034.

20 Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE035.

Vector pAVE020 y pAVE021

25 El vector de partida para la generación de pAVE020 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor  $\lambda$ pL en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 7 y 8.

Oligonucleótido 7 (SEQ ID NO 11)

**5'AATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGAGCGGAATT  
GTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

30

Oligonucleótido 8 (SEQ ID NO 12)

**5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCGCTCAGTATCACCGCCA  
GTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGAT**

35 Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE020.

40 Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE021.

Vectores pAVE016 y pAVE017

45 El vector de partida para la generación de pAVE016 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor tac en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 15 y 16.

Oligonucleótido 15 (SEQ ID NO 13)

**5'AATTCCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTG  
TGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

50

Oligonucleótido 16 (SEQ ID NO 14)

**5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCG  
ATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTTCAGG**

55 Se ligaron los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y se transformaron en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante

se denominó pAVE016.

Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE017.

5 Vector pAVE049

El vector de partida para la generación de pAVE049 fue pAVE017. No se alteró el casete de promotor tac. Para aumentar la separación entre los dos operadores desde 91 hasta 124 pares de bases, se introdujo por clonación un

10

Oligonucleótido 19 (SEQ ID NO 15)

5'AATTCACCGGTGTACAGTCATGTACAACCGGTG

15 Oligonucleótido 20 (SEQ ID NO 16)

5'AATTCACCGGTTGTACATGACTGTACACCGGTG

20 Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE049.

Tabla 1: Resumen de vectores pAVE

Plásmido	Promotor	Sistema de operador	Comentarios
pAVE041	tac/T7A1	Secuencia lac nativa individual	
pAVE017	tac	Secuencias palindrómicas perfectas dobles (DPPS)	Separación de operador de 91 pares de bases (DPPS91)
pAVE049	tac	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador 124 pares de bases (DPPS124)
pAVE013	T7A3	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador de 91 pares de bases (DPPS91)
pAVE030	T7A3	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador de 92 pares de bases (DPPS92)
pAVE021	$\lambda$ pL	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador de 91 pares de bases (DPPS91)
pAVE035	$\lambda$ pL	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador de 92 pares de bases (DPPS92)

25 2. Generación de cepas recombinantes

Se transformaron cepas de *E. coli* W3110 (disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo como cepa ATCC27325) y BL21 (disponible de EMD Biosciences Inc, San Diego, EE.UU.) mediante electroporación con los plásmidos tal como se describen en la tabla 2 a continuación. Se purificaron las cepas recombinantes resultantes y se mantuvieron en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

30

Tabla 2: Cepas recombinantes construidas

Huésped	Plásmido	Descripción (proteína:promotor:sistema de operador)	N.º de designación recombinante
ATCC27325	pAVE013	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS91	CLD018
ATCC27325	pAVE030	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS92	CLD026
ATCC27325	pAVE041	TNF $\alpha$ :tac/T7A1:lacO nativo individual	CLD043
ATCC27325	pAVE017	TNF $\alpha$ :tac:DPPS91	CLD019
ATCC27325	pAVE049	TNF $\alpha$ :tac:DPPS124	CLD050
ATCC27325	pAVE021	TNF $\alpha$ : $\lambda$ pL:DPPS91	CLD021
ATCC27325	pAVE035	TNF $\alpha$ : $\lambda$ pL:DPPS92	CLD038
BL21	pAVE013	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS91	CLD035
BL21	pAVE030	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS92	CLD028

35 Comparación 1

El vector de partida para la generación de un plásmido con el promotor T7A3 sin ningún operador fue pZT7#2.0. Se clonó un promotor T7A3 en este plásmido usando ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

Se preparó ligador 2122 hibridando los oligonucleótidos 21 y 22

Oligonucleótido 21 (SEQ ID NO 18)

**5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCACATG  
AAACGACAGTGAGTCA**

Oligonucleótido 22 (SEQ ID NO 19)

**5'CTAGTGACTCACTGTCGTTTCATGTGGTACCTCGTACCGTGTTTACTTCATGTTGTC  
10 AACCGTTTTGTTTCG**

Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. Se examinaron ochenta y dos clones mediante digestión de restricción y secuenciación.

No se identificó ningún clon con la secuencia de promotor T7A3 correcta (todos contenían mutaciones en la secuencia). Esto sugiere que la construcción de plásmidos que contienen este promotor constitutivo potente es problemática.

Comparación 2

El vector de partida para la generación de un plásmido con el promotor T7A3 bajo el control de una secuencia de operador lac nativa individual fue pZT7#2.0. Se clonó un promotor T7A3 y secuencia de operador Lac (LacO) nativa en este plásmido usando ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

Se preparó ligador 2324 hibridando los oligonucleótidos 23 y 24

Oligonucleótido 23 (SEQ ID NO 20)

**5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT  
TGTGAGCGGATAACAATCCCCA**

Oligonucleótido 24 (SEQ ID NO 21)

**5'CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATCCGGTACATCGTACCGTGTTTACTTCA  
TGTTGTCAACCGTTTTGTTTCG**

Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. Se examinaron noventa y cuatro clones mediante digestión de restricción y secuenciación. De nuevo no se identificó ningún clon con la secuencia correcta. Sin embargo, se encontró que un clon tenía una secuencia casi intacta. Este clon contenía una 'G' adicional en la secuencia aproximadamente en la posición -37. Es difícil asignar la posición exacta de la mutación puesto que la secuencia esperada contiene -GG- en esta región. Se clonó el gen de TNF $\alpha$  humano en el plásmido con la secuencia casi intacta como fragmento de Nde I/Xho I. Se examinaron veinte colonias de la cepa huésped de clonación XL-Blue MR (Stratagene). Una fue el clon positivo sin mutaciones (aparte de la 'G' adicional descrita anteriormente). Se transformó este plásmido en un huésped de producción (ATCC27325) y volvió a secuenciarse el plásmido.

Esto indicó que el plásmido contenía mutaciones visibles en las secuencias tanto de promotor T7A3 como de TNF $\alpha$  humano lo que indica que el uso del promotor T7A3, incluso bajo el control de la secuencia de operador lac nativa, da como resultado inestabilidad del plásmido.

Ejemplo 3

Se extrajeron viales de CLD018 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelaran. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y glucosa (1 g/l). Se incubó el cultivo de siembra a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l del cultivo de siembra para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió

anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}=0,5-0,7$ . En este punto se indujeron los matraces con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,05 mM y 1 mM. También se dejó un matraz sin inducir y se continuó la incubación de los matraces, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNF $\alpha$  dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. A continuación se resumen los resultados en la tabla 3.

Tabla 3

Tiempo con IPTG 0,05 mM (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)	Tiempo con IPTG 1 mM (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)
3	2	5	7
4	5	6	12
6	8	8	19
8	13	24	26
24	19		
24 (basal, sin IPTG)	No detectado		

Estos datos demostraron que puede realizarse un control adicional del promotor T7A3 potente usando dos secuencias de operador palindrómicas perfectas separadas por 91 pb. Se ha reducido significativamente la expresión basal (en ausencia de inductor) con respecto a la lograda usando un operador palindrómico perfecto individual para controlar la represión. El control de la expresión basal logrado usando las secuencias palindrómicas perfectas dobles era inesperado en comparación con el sistema de T7 del documento US 6.537.779 en el que el control de la expresión basal requiere dos elementos de control diferentes. En este ejemplo se logró el control de la expresión basal en un fondo alto de ARN polimerasa de *E. coli*.

## Ejemplo 4

Se extrajeron viales de CLD026 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelaran. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}=0,5-0,7$ . En este punto se indujeron los matraces con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,05 mM y 0,005 mM. También se dejó un matraz sin inducir y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNF $\alpha$  dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. A continuación se resumen los resultados en la tabla 4.

Tabla 4

Tiempo de inducción con IPTG 0,005 mM (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)	Tiempo de inducción con IPTG 0,05 mM (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)
8	15	8	17
24 (basal, sin IPTG)	No detectado		

Los resultados demostraron que cambiar la separación entre las dos secuencias de operador palindrómicas perfectas en 1 pb (desde 91 hasta 92 pb) no influyó de manera adversa en el rendimiento tanto en cuanto a la expresión basal como en cuanto al nivel de acumulación final logrado. Inesperadamente, reducir la concentración de IPTG 10 veces (desde 0,05 mM hasta 0,005 mM) no redujo significativamente la productividad inducida.

## Ejemplo 5

Se extrajo un vial de CLD019 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}=0,5-0,7$ .

En este punto se indujeron los matraces con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,5 mM, 0,1 mM, 0,05 mM y 0,005 mM. También se dejó un matraz sin inducir y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, y acumulación de hTNFα dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNFα usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Se presentan los resultados en la figura 1.

Los datos presentados en la figura 1 demostraron que la combinación del promotor tac con secuencias de operador palindrómicas perfectas dobles conduce a un sistema en el que puede modularse directamente la tasa de expresión mediante la concentración de IPTG usado para la inducción. Tales sistemas pueden aprovecharse para modular la expresión de proteínas heterólogas, por ejemplo, para maximizar la acumulación de proteínas en una forma soluble o para evitar el problema del efecto perjudicial que puede tener la secreción de proteínas heterólogas sobre el crecimiento y la productividad de células recombinantes.

Ejemplo 6

Se extrajeron viales de CLD021 y CLD038 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelaran. Se inocularon por separado 10 μl de cada disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 μg/ml) y glucosa (1 g/l). Éstos se incubaron a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 μl de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto se indujo un matraz con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 1 mM mientras que se dejó sin inducir un segundo matraz y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNFα dentro de las células bacterianas. Se determinó la acumulación de hTNFα usando geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue y análisis de inmunotransferencia de tipo Western (usando anticuerpo anti-hTNFα) siguiendo SDS-PAGE de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Se resumen los datos en la tabla 5. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la cepa CLD038 se presenta en la figura 2.

Tabla 5

Análisis	Acumulación de hTNFα - CLD021 (λpL:DPPS91)	Acumulación de hTNFα -CLD038 (λpL:DPPS92)
SDS-PAGE con Colloidal Blue (tras la inducción con IPTG )	No detectado	No detectado
Transferencia de tipo Western (tras la inducción con IPTG )	Positivo	Positivo (véase la figura 1)
SDS-PAGE con Colloidal Blue (Basal sin inducción con IPTG, 24 h)	No detectado	No detectado
Transferencia de tipo Western (Basal sin inducción con IPTG, 24 h)	No detectado	No detectado

Estos resultados demuestran que la combinación de secuencias de operador palindrómicas perfectas dobles con el promotor λpL con la separación de o bien 91 pb o bien 92 pb dio como resultado una represión muy ajustada. Las transferencias de tipo Western indican que no se detectó ninguna expresión basal de la proteína diana. Con la inducción se logró un nivel de expresión de bajo nivel. Estos resultados fueron totalmente inesperados dado que el promotor λpL es un promotor extremadamente potente. Un sistema de este tipo puede usarse, por ejemplo, para dirigir la expresión de proteínas de alta toxicidad a la célula huésped. Puede usarse cuando es ventajosa una expresión controlada, por ejemplo, para la expresión e inserción de proteínas de membrana.

Ejemplo 7

Se extrajeron viales de CLD028 y CLD035 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelaran. Se inocularon por separado 10 μl de cada disolución madre en glicerol descongelada en cada uno de 2x5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 μg/ml) y glucosa (1 g/l). Éstos se incubaron a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 μl de estos cultivos para inocular por separado matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto se indujeron los matraces con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNFα dentro de las células bacterianas. El nivel de acumulación de hTNFα se determinó usando

exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. A continuación se resumen los resultados en la tabla 6.

Tabla 6

5

CLD035: Promotor T7A3, operadores palindrómicos perfectos dobles con 91 pb de separación		CLD028: Promotor T7A3, operadores palindrómicos perfectos dobles con 92 pb de separación	
Tiempo (horas) tras la inducción con IPTG	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)	Tiempo (horas) tras la inducción con IPTG	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)
2	7	2	10
4	14	4	15
20	27	20	23

Estos datos tomados junto con los datos presentados en los ejemplos 4 y 5 anteriormente indicaron que pueden usarse las cepas tanto K-12 como B de *E. coli*.

## 10 Ejemplo 8

Se prepararon los inóculos de fermentación añadiendo 200  $\mu$ l de disolución madre en glicerol de cada una de las cepas descritas a continuación a un matraz de agitación con deflectores de 2,0 l que contenía 200 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con 15  $\mu$ g/ml de tetraciclina. Se hicieron crecer los inóculos durante 12 h a 37°C en un agitador-incubador con una agitación de 250 rpm. Se usó un inóculo de matraz de agitación de 200 ml para inocular un fermentador de 15 l de volumen de trabajo que contenía 10 l de medio de crecimiento discontinuo. Se llevaron a cabo fermentaciones en las condiciones de funcionamiento descritas a continuación. Se controló la temperatura a 37°C y el pH a 6,8, controlado mediante adición automática de hidróxido de amonio al 35% (p/v). El punto de referencia de tensión de oxígeno disuelto (dOT) fue del 30% de saturación de aire y se controló mediante ajuste automático de la velocidad del agitador del fermentador, desde un mínimo de 250 rpm hasta un máximo de 1500 rpm, y complementación automática de oxígeno a la corriente de gas de entrada. El flujo de aire hacia el recipiente de fermentador fue de 10 l/min. en todo momento. Se mantuvo la presión en el fermentador entre 50 y 200 mbar.

Se realizaron fermentaciones en modo discontinuo hasta agotamiento de la fuente de carbono (es decir glicerol) lo que se produjo aproximadamente 10 h tras la inoculación y se caracterizó por un aumento repentino de la dOT. Se inició la fermentación con alimentación discontinua en el punto de agotamiento de la fuente de carbono mediante la adición de una alimentación de glicerol/cloruro de magnesio a una velocidad de alimentación de 11 g de glicerol por l de medio por h. Se llevó a cabo la inducción mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM una vez que el nivel de biomasa en la fermentación alcanzó DO<sub>600</sub> = 50-60. Se continuó la fase con alimentación discontinua durante 12 h tras la inducción. Se tomaron muestras para determinar el nivel de biomasa (DO<sub>600</sub>) y la acumulación de hTNF $\alpha$  (% de TCP)/título de hTNF $\alpha$  (g/l) en la recogida (geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue).

En la tabla 7 se proporciona la composición del medio de crecimiento discontinuo.

Tabla 7

Componente	Concentración final [g/l], [mg/l] y [ml/l] de agua purificada
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,0
Glicerol	35,0
Extracto de levadura (Becton Dickinson)	20,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,5
Ácido cítrico	7,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,47
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 ml/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,294
Antiespumante AF204	0,2 ml/l
Tetraciclina	15 m g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	114 m g/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	29 m g/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	17 m g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	9 m g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4 m g/l
H <sub>3</sub> ·BO <sub>3</sub>	12 m g/l

En la tabla 8 se proporciona la composición de la alimentación de glicerol / cloruro de magnesio.

Tabla 8

Componente de alimentación	Cantidad requerida [g/l] de agua purificada
Glicerol	714
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,4

5

Se resumen los resultados en la tabla 9.

Tabla 9

Cepa	Descripción de vector expresión	DO600 en la recogida	Acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP) en la recogida	Título de hTNF $\alpha$ (mg/l) en la recogida
CLD018	Promotor T7A3, palíndromo perfecto doble con 91 pb de separación	147	29	8400
CLD026	Promotor T7A3, palíndromo perfecto doble con 92 pb de separación	204	34	11400
CLD019	Promotor tac, secuencia palindrónica perfecta doble con 91 pb de separación	196	22	8300

10

Los datos demuestran claramente la utilidad de los sistemas para la fabricación de proteínas heterólogas. Se lograron altos títulos de producto usando una fermentación no optimizada genérica sencilla y procedimientos de inducción.

15 Ejemplo 9

Se extrajo un vial de CLD050 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto se indujo un matraz con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,05 mM mientras que se dejó otro matraz sin inducir y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNF $\alpha$  dentro de las células bacterianas. El nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  se determinó usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. A continuación se resumen los resultados en la tabla 10.

30

Tabla 10

Tiempo tras la inducción (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP)
4	16
24 (basal, sin IPTG)	No detectado

35

Sorprendentemente la secuencia de operador palindrónica perfecta doble funcionó cuando se aumentó la separación. La separación del palíndromo perfecto doble puede alterarse, por ejemplo, para lograr un control eficaz de otros promotores.

Ejemplo 10

40

Se diseñó un diacuerpo tetravalente monocatenario biespecífico sintético (bsctDb), en el que se unieron las regiones ligera variable y pesada variable de D1.3 (anticuerpo anti-lisozima) y A5B7 (anticuerpo anti-CEA (antígeno carcinoembrionario)) en una única cadena polipeptídica. La secuencia de ADN para esta molécula se muestra en la figura 3 (SEQ ID NO 22). Esto se clonó como fragmento de Nde I/Not I en pAVE046 que se había digerido con Nde I y Not I. Se examinaron plásmidos recombinantes mediante digestión de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE078. Se transformó pAVE078 en W3110 de *E. coli* para preparar CLD073, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

45

Se extrajo un vial de CLD0073 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona

- 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 µg/ml) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl de este cultivo para inocular dos matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}=0,5-0,7$ .
- 5 En este punto se indujeron los matraces con IPTG hasta una concentración final de o bien 0,5 mM o bien 0,1 mM y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente durante 20 horas adicionales. Entonces se recogieron las células y el medio de crecimiento libre de células residual. Se sometieron además las células recogidas a fraccionamiento de células por choque osmótico para aislar la fracción celular que contenía proteínas que se habían repartido en la fracción periplásmica de *E. coli* soluble. Se estimó la expresión, la secreción, el
- 10 plegado y la acumulación de bsctDb D1.3-A5B7 biológicamente activo en el extracto periplásmico y medio de crecimiento residual determinando la inhibición de unión de un anticuerpo monoclonal anti-CEA a CEA (antígeno) en un ensayo de ELISA competitivo y mediante la unión de un fragmento de anticuerpo Fab anti-lisozima a lisozima (antígeno) en un ensayo de ELISA competitivo.
- 15 Los datos obtenidos indicaron que la mayor parte de bsctDb D1.3-A5B7 se repartió en el medio de crecimiento residual (fuga del periplasma) al final de la inducción. Estos datos (unión de bsctDb en ensayo de ELISA competitivo) se muestran en la tabla 11. Los datos obtenidos demuestran que la muestra de medio de crecimiento residual del cultivo inducido con IPTG 0,5 mM inhibe completamente la unión de los anticuerpos tanto anti-CEA como anti-lisozima en los ensayos de ELISA por competencia. La muestra de medio de crecimiento residual del
- 20 cultivo inducido con IPTG 0,1 mM muestra un nivel reducido de inhibición lo que indica un nivel de acumulación inferior de bsctDb D1.3-A5B7 biológicamente activo en esta muestra.

Tabla 11

Muestra	% de inhibición en ensayo de ELISA por competencia con CEA	% Inhibición en ELISA por competencia con D1.3
Control (sin bsctDb D1.3-A5B7)	Ninguno	Ninguno
Sobrenadante de cultivo inducido con IPTG 0,5 mM	100	100
Sobrenadante de cultivo inducido con IPTG 0,1 mM	Parcial	Parcial

- 25 Usando el nuevo sistema de expresión es posible producir proteínas heterólogas de múltiples cadenas complejas que han sido difíciles de producir usando *E. coli*. Esto se ha mostrado a modo de ejemplo demostrando que pueden producirse diacuerpos tetravalentes monocatenarios biespecificos en una forma biológicamente activa en *E. coli* usando el nuevo sistema de expresión. Esto muestra además a modo de ejemplo la utilidad del sistema de
- 30 expresión.

## Ejemplo 11

- 35 Se clonó el gen de fusión glutatión-S-transferasa-3C proteinasa (GST-3C) como fragmento de Nde I/Xho I en pAVE011 digerido con Nde I y Xho I. La secuencia del inserto se muestra en la figura 4 (SEQ ID NO 23). Se examinaron plásmidos recombinantes mediante digestión de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE052. Se transformó pAVE052 en BL21 de *E. coli* para preparar CLD054, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

- 40 Se clonó el gen interferón  $\alpha 2$  (IFN $\alpha 2$ ) humano como fragmento de Nde I/Xho I en pAVE011 digerido con Nde I y Xho I. La secuencia de ADN del inserto se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO 24). Se examinaron plásmidos recombinantes mediante digestión de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE058. Se transformó pAVE058 en W3110 de *E. coli* para preparar CLD059, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

- 45 Se clonó el gen de eritropoyetina (EPO) humana, que se había sometido a optimización de codones para su expresión en *E. coli*, como fragmento de Nde I/Xho I en pAVE011 digerido con Nde I y Xho I. La secuencia de ADN del inserto se muestra en la figura 6 (SEQ ID NO 25). Se examinaron plásmidos recombinantes mediante digestión de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE061. Se transformó pAVE061 en W3110 de *E. coli* para preparar CLD060, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.
- 50

- 55 Se llevaron a cabo fermentaciones con alimentación discontinua usando CLD054, CLD059 y CLD060 usando los medios y las condiciones de procedimiento descritos en el ejemplo 7. Se mantuvieron las fermentaciones a 30°C o 37°C tal como se describe en la tabla 19. Se realizaron fermentaciones en modo discontinuo hasta agotamiento de la fuente de carbono (es decir glicerol). Se inició la fermentación con alimentación discontinua en este punto mediante la adición de una alimentación que contenía glicerol (714 g/l) y sulfato de magnesio (30 g/l). Se llevó a cabo la inducción mediante la adición de IPTG una vez que el nivel de biomasa en la fermentación alcanzó  $DO_{600} = 50-60$ .

Las concentraciones de IPTG usadas se describen en la tabla 12. Se continuó la fase con alimentación discontinua durante 12-15 h tras la inducción. Se tomaron muestras a lo largo de la totalidad de las fermentaciones para determinar el nivel de biomasa ( $DO_{600}$ ) y título de producto de proteína ((GST-3C, IFN $\alpha$ 2 y EPO) (g/l), usando geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra).

5

Tabla 12

Cepa	Huésped <i>E. coli</i>	Descripción de proteína y vector expresión	Temp. de ferm. °C	Conc. de IPTG de inducción (mM)	DO600	Título de producto (g/l)
CLD 054	BL21	GST-3C T7A3:DPPS91	37	0,50	100	8
CLD 059	W3110	IFN $\alpha$ 2 T7A3:DPPS91	37	0,10	120	9
			37	0,25	150	14
			37	0,50	160	14
CLD 060	W3110	EPO T7A3:DPPS91	37	0,10	100	>13
			30	0,50	90	>13

Los datos presentados en la tabla 12 demuestran adicionalmente la utilidad de los sistemas para la fabricación de una amplia gama de proteínas heterólogas. Se logran altos títulos de producto usando un procedimiento de fermentación genérico sencillo acoplado con manipulación tan sólo de la concentración de IPTG usado para la inducción. Esto es particularmente beneficioso para reducir los plazos de desarrollo del procedimiento para proteínas heterólogas terapéuticamente útiles.

15 Ejemplo 12

Se clonó el gen de L-2-haloalcanoato deshalogenasa (hadL) de *Pseudomonas putida* usando sitios Nde I y Spe I que se habían modificado por ingeniería usando PCR. La secuencia génica se muestra en la figura 7 (SEQ ID NO 26). Se digirió el plásmido pAVE011 con Nde I y Spe I y se extrajo la banda con gel. Se digirió el gen hadL con Nde I y Spe I y se extrajo el gen hadL con gel y se ligó a pAVE011 para producir pAVE075. Se copió el origen de replicación de *Pseudomonas savastanoi* usando la PCR a partir de plásmido pCN60 (ATCC 77101; Nieto C, *et al.* (1990) Gene 87: 145-149).

25 Los cebadores usados fueron:

F37A: Secuencia: 5' AGATCTACGCTTATGGGTGCCTTTCC (SEQ ID NO 27), y

B29a: Secuencia: 5' AGATCTAATACGCAAACCGCCTCTCC (SEQ ID NO 28).

Se clonó el producto de PCR inicialmente en TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen) y luego en pAVE075 mediante digestión con Bgl II. Se transformó el plásmido resultante, pAVE086, en *Pseudomonas putida* NCIMB 12018, mediante electroporación para preparar CLD075, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C. Se extrajo un vial de CLD075 de un congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10  $\mu$ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml). Esto se incubó a 30°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l de este cultivo para inocular por separado dos matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 30°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}$ =0,5-0,7. En este punto se indujo un matraz con IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM mientras que se dejó sin inducir el segundo matraz para monitorizar la expresión basal. Se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento y acumulación de proteína HadL dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de HadL usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra.

La expresión y acumulación de proteína HadL se presentan en la figura 8. Los datos indican que el sistema de expresión de T7A3:DPPS91 funcionó en otro sistema de huésped procariota. Sorprendentemente, el sistema de expresión funcionó con la misma eficacia en *Pseudomonas putida* que la observada cuando se usó *E. coli* como sistema huésped. No se detectó expresión basal incluso tras 23 h de incubación en ausencia de inductor. Se logró un alto nivel de expresión y acumulación de proteína en *Pseudomonas putida* tras la inducción usando IPTG.

Ejemplo 13

Se llevó a cabo una fermentación con alimentación discontinua usando *Pseudomonas putida* CLD075 usando los medios de *E. coli* genéricos y las condiciones de procedimiento descritas en el ejemplo 7. Se mantuvieron las fermentaciones a 30°C y pH 7,0 (controlado con hidróxido de amonio al 25% y ácido fosfórico al 10%). Se realizaron

5 fermentaciones en modo discontinuo hasta agotamiento de la fuente de carbono (es decir glicerol). Se inició la fermentación con alimentación discontinua en este punto mediante la adición de una alimentación que contenía glicerol (714 g/l) y sulfato de magnesio (30 g/l). Se llevó a cabo la inducción mediante la adición de IPTG 1 mM (concentración final) una vez que el nivel de biomasa en la fermentación alcanzó  $DO_{600} = 50$ . Se continuó la fase con alimentación discontinua durante 12-15 h tras la inducción. Se tomaron muestras a lo largo de la totalidad de la fermentación para determinar el nivel de biomasa ( $DO_{600}$ ) y la acumulación de proteína HadL ((% de TCP) geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra). El crecimiento de CLD075 y la expresión/acumulación de proteína HadL tras la inducción se presentan en la figura 9.

10 Se lograron altos niveles de expresión y acumulación de proteína (>40% TCP) usando el sistema de expresión en *Pseudomonas putida* incluso usando únicamente un medio de crecimiento genérico diseñado para su uso con *E. coli*.

15 Ejemplo 14

Se clonó un gen represor Gal sintético (*E. coli*) en vector pZen042 (tal como se describe en el documento EP 0 502 637) como fragmento de PstI en el sitio PstI. Se identificaron clones con el gen represor Gal en orientaciones tanto horaria como anti-horaria. Se seleccionó un clon con orientación anti-horaria para generar pAVE071.

20 Se inició la construcción de secuencias de promotor y operador Gal en plásmido pZT7#2.0, preparado tal como se describe en el documento US 6.537.779. pZT7#2.0 tiene una estructura principal de vector pAT153, secuencia de estabilidad cer, tet A/R, una secuencia de operador lac nativa individual en el sentido de 5' del gen de interés y un terminador de la transcripción de T4 en el sentido de 5'. Se modificó la secuencia de operador Gal nativa para producir una secuencia de operador palindrómica perfecta. Ésta se clonó en el plásmido descrito anteriormente usando ligadores sintéticos por medio de sitios de enzimas de restricción EcoRI y XbaI. Se preparó el ligador GalB hibridando los oligonucleótidos GalB1 y GalB2:

GalB1 (SEQ ID NO 29)

**5'AATTCATACCATAAGCCTAATTCTACGAATTATCAGAGTTCTGGTTACCGGT  
30 GTAAGCGCTTACACTGT**

GalB2 (SEQ ID NO 30)

**5'CTAGACAGTGTAAGCGCTTACACCGGTAACCAGAACTCTGATAATTCGTAGA  
35 ATTAGGCTTATGGTATG**

Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de EcoR I/Xba I. Se realizó un examen inicial de transformantes mediante digestión de restricción usando AgeI. Se confirmó la secuencia mediante secuenciación. Se clonó el gen de hTNF $\alpha$  en este plásmido como fragmento NdeI/XhoI.

Se clonaron el gen de hTNF $\alpha$  y la secuencia de operador palindrómica perfecta Gal parcial digiriendo con XmaI y MscI y ligando en pAVE071 digerido con XmnI y XmaI. Se examinaron clones para determinar la presencia del gen de hTNF $\alpha$  mediante digestión de restricción.

45 Se clonaron cada uno de promotor Gal y operador Gal palindrómico perfecto el sentido de 5' en este plásmido usando ligadores sintéticos por medio de sitios StuI y EcoRI. Se preparó ligador GalA hibridando los oligonucleótidos GalA1 y GalA2:

GalA1 (SEQ ID NO 31):

**5'CAATTGTGTAAGCGCTTACACAACCTTTATTCCATGTCACACTTTTCGCATCTT  
50 TGTTATGCTATGGTG**

GalA2 (SEQ ID NO 32)

**5'AATTCACCATCGCATAACAAGGATGCGAAAAGTGTGACATGGAATAAAGTTG  
55 TGTAAGCGCTTACACAATTG**

Se detectó la presencia del ligador con digestión con MfeI y se confirmó mediante secuenciación. Se transformó este plásmido en cepa W3110 de *E. coli* para generar CLD085, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

60

5 Se extrajo un vial de CLD085 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10 µl de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 µg/ml). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl de este cultivo para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubó el matraz a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta  $DO_{600}=0,5-0,7$ . En este punto se indujo el matraz con galactosa hasta una concentración final de 10,0 mM. Se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNF $\alpha$  dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  usando análisis de inmunotransferencia de tipo Western (usando anticuerpo anti-hTNF $\alpha$ ) tras SDS-PAGE de las bacterias tomadas como muestra. Los datos se presentan en la figura 11. Esto demuestra que usar secuencias de operador gal perfectamente palindrómicas en combinación con un gen represor gal conduce a una represión muy ajustada del promotor gal en ausencia de inductor mientras que sorprendentemente todavía se mantiene la capacidad de inducción cuando se añade el inductor galactosa.

15 **Lista de secuencias**

<110> Avecia Biologics Limited

20 <120> Sistema de expresión

<130> SMC 60733/WO

<160> 40

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 47

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

35 <400> 1

catgtgggaa ttgtgagcgc tcacaattcc aagaacaatc ctgcacg 47

40 <210> 2

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

45 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 2

50 aattcgtgca ggattgttct tggattgtg agcgctcaca attccca 47

<210> 3

<211> 77

<212> ADN

55 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

60 <400> 3

aattcaaca aaacggttga caacatgaag taaacacggt acgatgtacc ggaattgtga 60

gcgctcaca ttcccca 77

<210> 4

<211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 4  
 ctgggtggggg gttgtgggcg ctcgcggttc cgggtcgcgcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60  
 10 gtcggccggtt ttgtttg 77  
 <210> 5  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 20 <400> 5  
 aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcacggctc ggatactgtg tggaattgtg 60  
 agcggataac aattcccca 79  
 <210> 6  
 25 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Secuencia artificial  
 <400> 6  
 ctagtgggga attgttatcc gctcacaatt ccacacagta tccgagccga tgattaattg 60  
 tcaacagctc atttcagaa 79  
 35 <210> 7  
 <211> 78  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 7  
 45 aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcacggctc ggatactgtg tggaattgtg .60  
 agcgctcaca attcccca 78  
 <210> 8  
 <211> 78  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 55 <400> 8

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacagtat ccgagccgat gattaattgt 60  
 caacagctca tttcagaa 78  
 <210> 9  
 <211> 78  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 10 <400> 9  
 aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60  
 agcgctcaca attcccca 78  
 15 <210> 10  
 <211> 78  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 10  
 ctggtggggg gttgtggcg ctcgcggttc cggtgcgtcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60  
 25 gtcggccggt ttgtttcg 78  
 <210> 11  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 35 <400> 11  
 aattatctct ggcggtggtg acataaatac cactggcggg gatactgagc ggaattgtga 60  
 gcgctcaciaa ttcccca 77  
 <210> 12  
 40 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> Secuencia artificial  
 <400> 12  
 ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg 60  
 50 tcaacaccgc cagagat 77  
 <210> 13  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 13

aattcctgaa atgagctggt gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga 60  
 gcgctcaciaa ttcccca 77

5 <210> 14  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia artificial

15 <400> 14

ctagtgggga atttgagcgc ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt 60  
 caacagctca tttcagg 77

20 <210> 15  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 15

aattcaccgg tgtacagtca tgtacaaccg gtg 33

30 <210> 16  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 16

40 aattcaccgg ttgtacatga ctgtacaccg gtg 33

45 <210> 17  
 <211> 1550  
 <212> ADN  
 <213> ratón

<400> 17

catatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt tattactcgc tgcccaacca 60  
 gcgatggccc aggtgcagct gcaggagtca ggacctggcc tggaggcc ctcacagagc 120  
 ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatgggtgt aaactgggtt 180  
 cgccagcctc caggaaagg tctggagtgg ctgggaatga tttgggggtga tggaaacaca 240  
 gactataatt cagctctcaa atccagactg agcatcagca aggacaactc caagagccaa 300  
 gttttcttaa aatgaacag tctgcacact gatgacacag ccagggtacta ctgtgccaga 360  
 gagagagatt ataggcttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcc 420  
 tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggag tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctccagta gcttgggcac ccagacctac 660  
 atctgcaacg tgaatcacia ccccagcaac accaaggctc acaagaaagt tgagcccaaa 720  
 tcttcaacta agacgcacac atcaggagggt gaacagaagc tcatctcaga agaggatctg 780  
 aattaataag ggagcttgca tgcaaattct atttcaagga gacagtcata atgaaatacc 840  
 tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgtctc ccaaccagcg atggccgaca 900  
 tcgagctcac ccagtctcca gcctcccttt ctgcgtctgt gggagaaact gtcacatca 960  
 catgtcgagc aagtgggaat attcacaatt atttagcatg gtatcagcag aaacagggaa 1020  
 aatctcctca gctcctggtc tattatacaa caaccttagc agatgggtgtg ccatcaaggt 1080  
 tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg caacctgaag 1140  
 cttttgggag ttattactgt caacattttt ggagtactcc tcggacgttc ggtggagggg 1200  
 ccaagctcga gatcaaacgg actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg 1260  
 atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca 1320  
 gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 1380  
 gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga 1440  
 gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga 1500  
 gttcgcccgt cacaaagagc ttcaaccgcg gagagtcata gtaaggatcc 1550

5 <210> 18  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 18

aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cacatgaaac 60

gacagtgagt ca 72

15 <210> 19  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 19

ctagtgactc actgtcgttt catgtggtac ctcgtaccgt gtttacttca tgttgtaac 60  
 cgttttgttt cg 72  
 5 <210> 20  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Secuencia artificial  
 <400> 20  
 aattcgaac aaaacggtg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60  
 agcggataac aattcccca 79  
 15 <210> 21  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 21  
 25 ctagtgggga attgttatcc gctcacaatt ccggtacatc gtaccgtgtt tacttcatgt 60  
 tgtcaaccgt tttgtttcg 79  
 <210> 22  
 30 <211> 1592  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Proteína artificial producida en el ejemplo 15  
 <400> 22

ES 2 436 883 T3

catatgaaaa agacagctat cgcgattgca gtggcactgg ctggtttcgc taccgtagct 60  
 caagcccagg tgcagctgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 120  
 tccatcacat gcaccgtctc agggttctca ttaaccggct atgggtgtaa ctgggttcgc 180  
 cagcctccag gaaaggtctt ggagtggtg ggaatgattt ggggtgatgg aaacacagac 240  
 tataattcag ctctcaaatc cagactgagc atcagcaagg acaactcaa gagccaagtt 300  
 ttcttaaaaa tgaacagtct gcacactgat gacacagcca ggtactactg tgccagagag 360  
 agagattata ggcttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctgagcctcc 420  
 accaagggcc catcgagcgc caaaaccacc ccggacatcg agctctccca gtctccagca 480  
 atcctgtctg catctccagg ggagaaggtc acaatgactt gcagggccag ctcaagtgt 540  
 acttacattc actggtacca gcagaagcca ggatcctccc ccaaactcctg gatttatgcc 600  
 acatccaacc tggcttctgg agtcctgtct cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctct 660  
 tactctctca caatcagcag agtggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccaacat 720  
 tggagtagta aaccaccgac gttcggtgga ggaccaagc tcgagatcaa acggactgtg 780  
 cgcgccgatg ccgccccgac cgtgcagggtg cagctgcagg aatctggtgg tggcttagtt 840  
 caacctggtg gttccctgag actctcctgt gcaacttctg ggttcacctt cactgattac 900  
 tacatgaact gggtcgcca gcctccagga aaggcacttg agtggttggg ttttattgga 960  
 aacaaagcta atggttacac aacagagtac agtgcactcg tgaagggctg gttcaccatc 1020  
 tccagagata aatcccaaag catcctctat cttcaaatga acaccctgag agctgaggac 1080  
 agtgccactt attactgtac aagagatagg gggctacggt tctactttga ctactggggc 1140  
 caaggcacca cggtcaccgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcgag cgccaaaacc 1200  
 accccggaca tcgagctcac ccagtctcca gcctcccttt ctgctctgt gggagaaact 1260  
 gtcaccatca catgtcgagc aagtgggaat attcacaatt attagcatg gtatcagcag 1320  
 aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tattatacaa caaccttagc agatggtgtg 1380  
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg 1440  
 caacctgaag cttttgggag ttattactgt caacattttt ggagtactcc tcggacgttc 1500  
 ggtggagggg ccaagctcga gatcaaacgg actgtgggat ccgaacaaaa gctgatctca 1560  
 gaagaagacc taaactcatg ataagcggcc gc 1592

<210> 23  
 <211> 1237  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Proteína de fusión GST producida en el ejemplo 16  
 <400> 23

ES 2 436 883 T3

catatgtccc ctatactagg ttattgaaa attaagggcc ttgtgcaacc cactcgactt 60  
 cttttggaat atcttgaaga aaaatatgaa gagcatttgt atgagcgca tgaaggtgat 120  
 aaatggcgaa acaaaaagtt tgaattgggt ttggagtctt ccaatcttcc ttattatatt 180  
 gatggtgatg ttaaattaac acagtctatg gccatcatac gttatatagc tgacaagcac 240  
 aacatggttg gtggttgctc aaaagagcgt gcagagattt caatgcttga aggagcggtt 300  
 ttggatatta gatacggtgt ttcgagaatt gcatatagta aagactttga aactctcaaa 360  
 gttgattttc ttagcaagct acctgaaatg ctgaaaatgt tcgaagatcg tttatgtcat 420  
 aaaacatatt taaatgggtga tcatgtaacc catcctgact tcatgttgta tgacgctctt 480  
 gatgttggtt tatacatgga cccaatgtgc ctggatgcgt tcccaaaatt agtttggttt 540  
 aaaaaacgta ttgaagctat cccacaaatt gataagtact tgaatccag caagtatata 600  
 gcatggcctt tgcagggctg gcaagccacg tttggtgggt gcgaccatcc tccaaaatcg 660  
 gatctgggtc cgctggatc cggaccaaac acagaatttg cactatccct gttaaggaaa 720  
 aacataatga ctataacaac ctcaaagga gagttcacag ggttaggcat acatgatcgt 780  
 gtctgtgtga taccacaca cgcacagcct ggtgatgatg tactagttaa tggtcagaaa 840  
 attagagtta aggataagta caaattagta gatccagaga acattaatct agagcttaca 900  
 gtgttgactt tagatagaaa tgaaaaattc agagatatca ggggatttat atcagaagat 960  
 ctagaagggtg tggatgccac tttggtagta cattcaaata actttacca cactatctta 1020  
 gaagttggcc ctgtaacaat ggcaggactt attaatttga gtagcacccc cactaacaga 1080  
 atgattcgtt atgattatgc aacaaaaact gggcagtgtg gaggtgtgct gtgtgctact 1140  
 ggtaagatct ttggtattca tgttggcggg aatggaagac aaggattttc agctcaactt 1200  
 aaaaaacaat atttttaga gaaacaataa gaattcc 1237

<210> 24  
 <211> 513  
 <212> ADN  
 <213> humano

5

<400> 24  
 catatgatgt gtgatctgcc gcaaactcat agcctgggta gccgtcgac cctgatgctg 60  
 ctggcccaaa tgcgccgat ctcectgtc tcctgtctga aagaccgca tgactttggc 120  
 ttcccgcagg aagagttcgg taaccagttc caaaaggcag aactatccc ggtactgcac 180  
 gaaatgattc aacagatttt taacctgtc agcactaaag actcctctgc tgcattggac 240  
 gaaactctcc tggacaaatt ctacaccgaa ctgtaccagc aactgaacga cctggaagcc 300  
 tgcgtcatcc aggtgtttg cgtaaccgaa actccgctga tgaaagaaga ctccatcctg 360  
 gctgttcgca aatacttcca gcgtatcacc ctgtacctga aagagaagaa atacagcccg 420  
 tgcgcttggg aagttgtacg cgtgaaatc atcgcttctc tcagcctgtc cactaacctg 480  
 caagaatctc tgcgtagcaa agaataactc gag 513

10

<210> 25  
 <211> 517  
 <212> ADN  
 <213> humano

15

<400> 25

ES 2 436 883 T3

catatggctc cgccacgtct gatttgtgac tctcgcgttc tggagcgta cctgctggag 60  
 gccagggaag ccgaaaacat caccgaccgt tgtgcggaac attgctctct gaatgagaac 120  
 atcactgttc cggatacga ggttaacttc tacgcttggg aacgtatgga agtaggccag 180  
 caggcagtag aagtgtggca gggctctggcg ctgctgtccg aagcggttct gcgtggccag 240  
 gcgctgctgg tcaactccag ccagccgtgg gagccgtgc agctgcacgt agataaagcg 300  
 gttagcggtc tgcgttcctt gactaccctg ctgcgcgcgc tgggtgcgca aaaagaagct 360  
 atctccccgc cagatgcggc atctgcagcc ccgctgcgta ccatcactgc agatactttc 420  
 cgcaagctgt ttcgtgttta ttccaacttc ctgcgtggta aactgaagct gtacaccggt 480  
 gaagcgtgcc gtaccggcga tcgttaataa actcgag 517

<210> 26  
 <211> 713  
 5 <212> ADN  
 <213> *Pseudomonas putiva*

<400> 26  
 catatgaagg aaataaccaa tgaaaaacat ccaaggtatc gttttcgatt tgtatggcac 60  
 gctctacgac gtgcattccg tgggtgcaagc ctgtgaagag gtctatccgg gccaaaggca 120  
 cgctatttct cgcctctggc ggcaaaagca attggaatac acctggctca ggagcctcat 180  
 gggccgttac gtgaactttg agaaagcaac agaggatgcc ttgcgcttta cctgcacgca 240  
 tctgggcttg tgcctcgatg atgaaacca ccagcgcctc agtgatgctt atttgcacct 300  
 cacccttat gccgatacag ctgacgccgt tcgccgtttg aaagctgcgg gcctaccgct 360  
 aggcattcatt tcaaatggtt ctcatgctc gatcgagcaa gtcgtgacta actctgaaat 420  
 gaattgggcg ttcgatcagc tgatcagcgt cgaggatgtg caagtgttca aacctgatag 480  
 tcgctctat agccttgccg agaagcgcag gggttttcca aaggaaaaca tcctcttcgt 540  
 ttcgtcaaac gcgtgggatg cgagtgcagc cagtaacttt ggtttcccg tttgctggat 600  
 caatcggcag aacggcgcgt ttgatgagct ggatgcaaag ccgacacacg tcgtgcgtaa 660  
 tctcggcga atgtcgaact ggctggttaa ttcgctcgat taatgaagga tcc 713

10 <210> 27  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia artificial

20 <400> 27  
 agatctacgc ttatgggtgc ctttcc 26

25 <210> 28  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 28  
 agatctaata cgcaaaccgc ctctcc 26

ES 2 436 883 T3

<210> 29  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 29  
 10  
**aattcataacc ataagcctaa ttctacgaat tatkagagtt ctggttaccg gtgtaagcgc 60**  
**ttactactgt 69**  
 <210> 30  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 20  
 <400> 30  
**ctagacagtg taagcgctta caccggtaac cagaactctg ataattcgta gaattaggct 60**  
**tatggtatg 69**  
 25  
 <210> 31  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 31  
**caattgtgta agcgcttaca caactttatt ccatgtcaca cttttcgcat ctttgttatg 60**  
 35  
**ctatgggtg 68**  
 <210> 32  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> ligador  
 45  
 <400> 32  
**aattcaccat cgcataacaa ggatgcgaaa agtgtgacat ggaataaagt tgtgtaagcg 60**  
**cttacacaat tg 72**  
 <210> 33  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 55  
 <400> 33

ES 2 436 883 T3

catatgccaa gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat 60  
 gccagttaca tgaccttacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac 120  
 gctattatac catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga tagcggtttg 180  
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 240  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta ataaccccgc cccgttgacg caaatgggga 300  
 attgtgagcg ctcaacaattc ctctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatca 360  
 ctagatgcgt acagtccgat gacttgcagtg gaattgtgag cgctcacaat tccaagcttt 420  
 attgcggtat aggctagc 438

<210> 34  
 <211> 813  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia artificial

10 <400> 34

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgtaca agcttggatc cgcagagccc 120  
 aaatcttgatg acaaaactca cacatgccca cctgtcccag cacctgaact cctgggggga 180  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 240  
 gaggtcacat gcgtgggtgtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 300  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcggggagga gcagtacaac 360  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 420  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 480  
 aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 540  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 600  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 660  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 720  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 780  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 813

15 <210> 35  
 <211> 1104  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de clones 1 usada en el ejemplo 20

25 <400> 35

ES 2 436 883 T3

ctcgaggcat gtgctctgta tgtatataaa actcttgttt tcttcttttc tctaaatatt 60  
ctttccttat acattaggac ctttgcagca taaattacta tacttctata gacacgcaaa 120  
cacaataca cacactaaat ggcggagctg aattacattc ccaaccgctg ggcacaacaa 180  
ctggcgggca aacagtcggt gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcacgcg 240  
ccgtcgcaaa ttgtcgcggc gattaaatct cgcgccgatc aactgggtgc cagcgtgggtg 300  
gtgtcgatgg tagaacgaag cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcgggtgca caatcttctc 360  
gcgcaacgcg tcagtgggct gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct 420  
gtggaagctg cctgcactaa tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc 480  
atcaacagta ttattttctc ccatgaagac ggtacgcgac tgggcgtgga gcatctggtc 540  
gcattgggtc accagcaaat cgcgctgtta gcgggcccat taagttctgt ctcggcgcgt 600  
ctgctctggt ctggctggca taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa 660  
cgggaaggcg actggagtg ccatgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag 720  
ggcatcgttc ccactgcgat gctggttgcc aacgatcaga tggcgtggg cgcaatgcgc 780  
gccattaccg agtccgggct gcgcgttggg gcggatatct cggtagtggg atacgacgat 840  
accgaagaca gctcatgtta tatcccgcg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg 900  
ctggggcaaa ccagcgtgga ccgcttgctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc 960  
aatcagcttt tgcccgtctc actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa 1020  
accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagc tcgcacgaca ggtttcccga 1080  
ctggaagcg ggcagtgact cgag 1104

<210> 36  
<211> 1026  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Secuencia de clones 2 usada en el ejemplo 20

<400> 36

ggatcctagg caataattat gagataaatg gtgcagcact attaagtagt gtggatttca 60  
ataatttccg aattaggaat aatgcgcta aatagacatc ccgttctctt tggtaatctg 120  
cataattctg atgcaatatc caacaactat ttgtgcaatt atttaacaaa atccaattaa 180  
ctttcctaata tagtccttca atagaacatc tgtattcctt tttttatga acaccttctt 240

ES 2 436 883 T3

	aattaggcca tcaacgacag taaatTTTgc cgaatTTaat agcttctact gaaaaacagt	300
	ggaccatgtg aaaagatgca tctcatttat caaacacata atattcaagt gagccttact	360
	tcaattgtat tgaagtgcaa gaaaaccaa aagcaacaac aggtTTTgga taagtacata	420
	tataagggaa ttgtgagcgc tcacaattcc tgttactggt cttacgattc atttacgatt	480
	caagaatagt tcaaacaaga agattacaaa ctatcaatgg aattgtgagc gtcacaatt	540
	ccaagaatga gatttccttc aatTTTtact gctgTTTtat tcgcagcadc ctccgcatta	600
	gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgct	660
	atcggttact cagatttaga aggggatttc gatgTTgctg tTTTgccatt ttccaacagc	720
	acaaataacg ggTTattgTT tataaatact actattgccca gcattgctgc taaagaagaa	780
	ggggatctc tcgagaaaag agaggctgaa gctgctcaag aaccagTtaa aggtcctgtg	840
	tctactaagc caggTTctTg tcctattatc ttgattcgtt gcgctatgTT aaaccacct	900
	aaCgTTgtt tgaaggacac tgattgtcca ggtatcaaaa agtgctgtga aggttcctgc	960
	ggTatggctt gTTTcgTtcc acaagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgtaatag	1020
	cagctg	1026
	<210> 37	
	<211> 78	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia artificial	
	<400> 37	
	aatTTTctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggaattgtg	60
	agcgctcaca attcccca	78
15	<210> 38	
	<211> 78	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 38	
	ctagtgggga attgtgagcg .ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt	60
25	caacagctca tttcagaa	78
	<210> 39	
	<211> 78	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
35	<400> 39	
	aattcatctc tggcggTgtt gacataaata ccactggcgg tgatactgag cggaattgtg	60
	agcgctcaca attcccca	78
40	<210> 40	

ES 2 436 883 T3

<211> 78  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 40

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg 60

tcaacaccgc cagagatg 78

**REIVINDICACIONES**

1. Sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en secuencias de operador palindrómicas perfectas para la expresión de proteínas en células procariotas, que comprende:
  - a) un promotor; y
  - b) dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor;
 caracterizado porque el promotor no es de T7.
2. Plásmido para la expresión de proteínas en células procariotas que comprende:
  - a) un promotor; y
  - b) dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor;
 caracterizado porque el promotor no es de T7.
3. Plásmido según la reivindicación 2, que comprende además un casete de expresión para una proteína.
4. Plásmido según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, siendo el plásmido un plásmido de replicación autónoma.
5. Plásmido según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, siendo el plásmido un plásmido de integración.
6. Célula huésped transformada mediante un plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
7. Célula huésped según la reivindicación 6, siendo la célula huésped *E. coli*.
8. Método para la producción de una proteína recombinante en una célula procariota que comprende expresar un sistema de expresión que comprende
  - a) un promotor;
  - b) dos o más secuencias de operador palindrómicas perfectas; y
  - c) un casete de expresión para una proteína recombinante, estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 3' del promotor, y estando ubicada al menos una secuencia de operador en el sentido de 5' del promotor;
 caracterizado porque el promotor no es de T7.
9. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en los que el promotor es un promotor de polimerasa de célula huésped.
10. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según la reivindicación 9, en los que el promotor es un promotor de ARN polimerasa de *E. coli*.
11. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en los que el promotor es T7A1, T7A2, T7A3,  $\lambda$ pL,  $\lambda$ pR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA o rrnB.
12. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en los que el sistema de operador es lac, gal, deo o gln.
13. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en los que se emplean dos secuencias de operador palindrómicas perfectas.
14. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según la reivindicación 13, en los que las secuencias de operador están separadas por desde 85 hasta 150 pares de bases.
15. Sistema de expresión, plásmido, célula huésped o método según la reivindicación 14, en los que las

secuencias de operador están separadas por 91 ó 92 pares de bases.

16. Método para producir una proteína recombinante, que comprende:

5 a) cultivar una célula huésped procariota transformada con un plásmido según la reivindicación 3; y

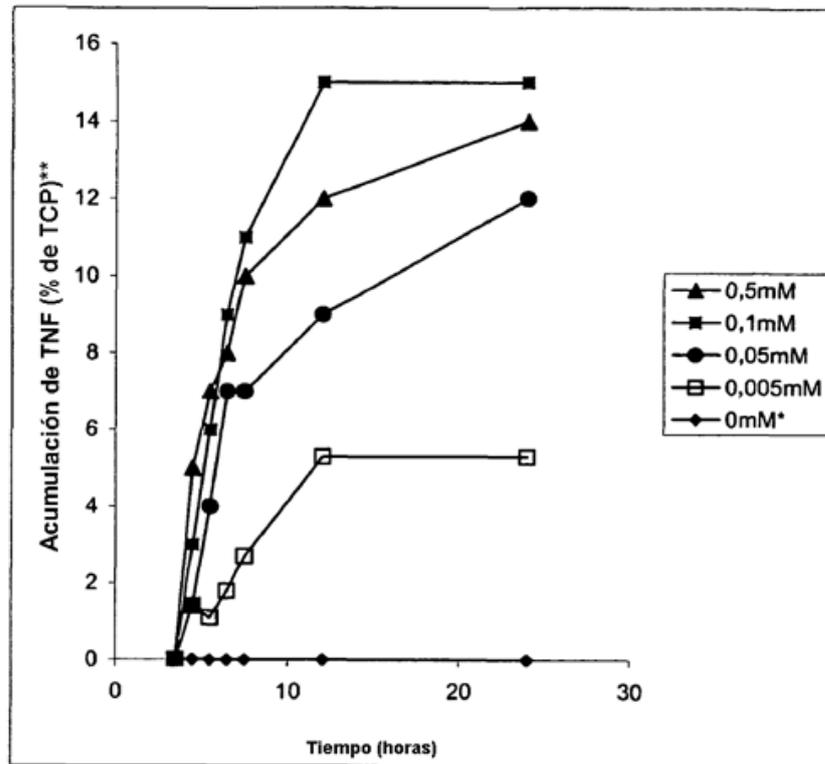
b) recuperar la proteína.

17. Método según la reivindicación 16, en el que la célula huésped es *E. coli*.

10

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, en el que el plásmido es un plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.

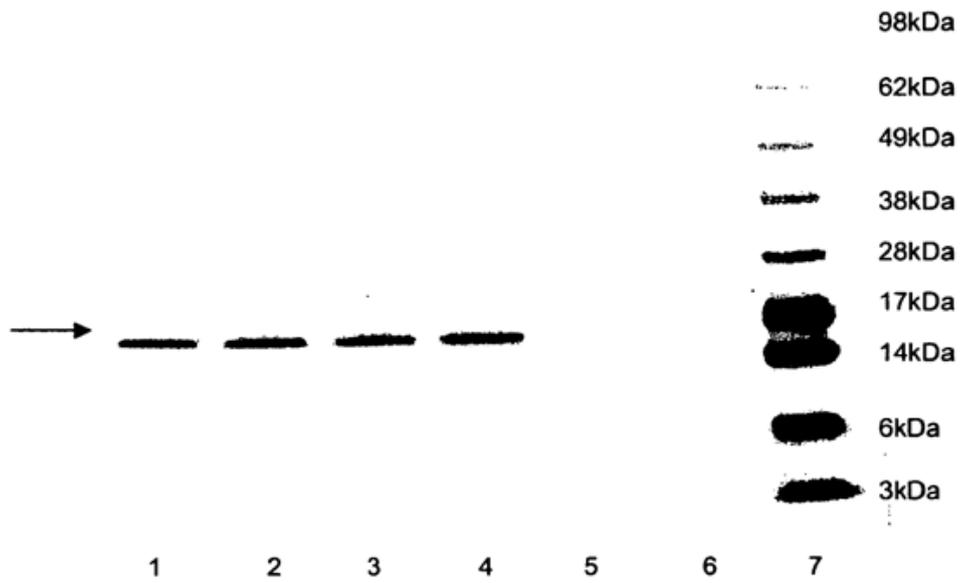
Figura 1



(\*) = Expresión basal, sin inductor (IPTG) añadido

(\*\*) = % de TCP, % de proteína celular total

Figura 2



La flecha indica la banda de hTNF $\alpha$

Carril 6: CLD038: 2 h de incubación (antes de la inducción)

Carril 5: CLD038: 4 h de incubación (antes de la inducción)

Carril 4: CLD038: 1 h tras la inducción con IPTG

Carril 3: CLD038: 2 h tras la inducción con IPTG

Carril 2: CLD038: 3 h tras la inducción con IPTG

Carril 1: CLD038: 4 h tras la inducción con IPTG

Carril 7: Marcadores de peso molecular

Figura 3

Secuencia de diacuerpo tetravalente monocatenario biespecifico (bsctDb) D1.3-A5B7 (SEQ ID NO 22)

CATATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTA  
GCTCAAGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCAC  
AGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTGTA  
ACTGGGTTCCGAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTTGGGGT  
GATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGAC  
AACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCACACTGATGACACAGCCA  
GGTACTACTGTGCCAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACC  
ACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGAGCGCCAAAACACCCC  
GGACATCGAGCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG  
TCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAACCTTACATCACTGGTACCAGCAGA  
AGCCAGGATCCTCCCCAAATCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAG  
TCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTACAATCAGCA  
GAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACATTGGAGTAGTAAACCAC  
CGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGCGCGCCGATGC  
CGCCCCGACCGTGCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGTGGTGGCTTAGTTCAACCTG  
GTGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCACTGATTACTACAT  
GAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACCTGAGTGGTTGGGTTTTATTGGAA  
ACAAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCA  
TCTCCAGAGATAAATCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGA  
GGACAGTGCCACTTATTACTGTACAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCTACTTTGACTA  
CTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGA  
GCGCCAAAACACCCCGGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCG  
TCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATT  
TAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAAC  
AACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATA  
TTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAACCTGAAGCTTTTGGGAGTTATTACTGTCAACAT  
TTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCCGTGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGAC  
TGTGGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCATGATAAGCGGC  
CGC

Figura 4

Secuencia de fusión GST-3C (SEQ ID NO 23)

CATATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGAC  
TTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGG  
TGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTAT  
TATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTTATATAGCTGA  
CAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGA  
AGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT  
GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAG  
ATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATG  
TTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCC  
CAAATTAGTTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTG  
AAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGT  
GGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCGGACCAAACACAGA  
ATTTGCACTATCCCTGTTAAGGAAAAACATAATGACTATAACAACCTCAAAGGGAGAG  
TTCACAGGGTTAGGCATACATGATCGTGTCTGTGTGATACCCACACACGCACAGCCT  
GGTGATGATGTAAGTGAATGGTCAGAAAATTAGAGTTAAGGATAAGTACAAATTAG  
TAGATCCAGAGAACATTAATCTAGAGCTTACAGTGTGACTTTAGATAGAAATGAAAA  
ATTCAGAGATATCAGGGGATTTATATCAGAAGATCTAGAAGGTGTGGATGCCACTTTG  
GTAGTACATTCAAATAACTTTACCAACACTATCTTAGAAGTTGGCCCTGTAACAATGG  
CAGGACTTATTAATTTGAGTAGCACCCCCACTAACAGAATGATTCGTTATGATTATGC  
AACAAAAACTGGGCAGTGTGGAGGTGTGCTGTGTGCTACTGGTAAGATCTTTGGTAT  
TCATGTTGGCGTAATGGAAGACAAGGATTTTCAGCTCAACTTAAAAACAATATTTT  
GTAGAGAAACAATAAGAATTCC

Figura 5

Secuencia de interferón  $\alpha 2$  (SEQ ID NO 24)

CATATGATGTGTGATCTGCCGCAAACATAGCCTGGGTAGCCGTCGCACCCTGATG  
CTGCTGGCCCAAATGCGCCGTATCTCCCTGTTCTCCTGTCTGAAAGACCGCCATGAC  
TTTGGCTTCCCGCAGGAAGAGTTCGGTAACCAGTTCAAAAGGCAGAACTATCCCG  
GTA CTGCACGAAATGATTCAACAGATTTTTAACCTGTT CAGCACTAAAGACTCCTCT  
GCTGCATGGGACGAAACTCTCCTGGACAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAACTG  
AACGACCTGGAAGCCTGCGTCATCCAGGGTGTGGCGTAACCGAAACTCCGCTGAT  
GAAAGAAGACTCCATCCTGGCTGTTGCAAATACTTCCAGCGTATCACCTGTACCT  
GAAAGAGAAGAAATACAGCCCGTGCCTTGGGAAGTTGTACGCGCTGAAATCATGC  
GTTCTTCAGCCTGTCCACTAACCTGCAAGAATCTCTGCGTAGCAAAGAATAACTCG  
AG

Figura 6

Secuencia de eritropoyetina (EPO) (SEQ ID NO 25)

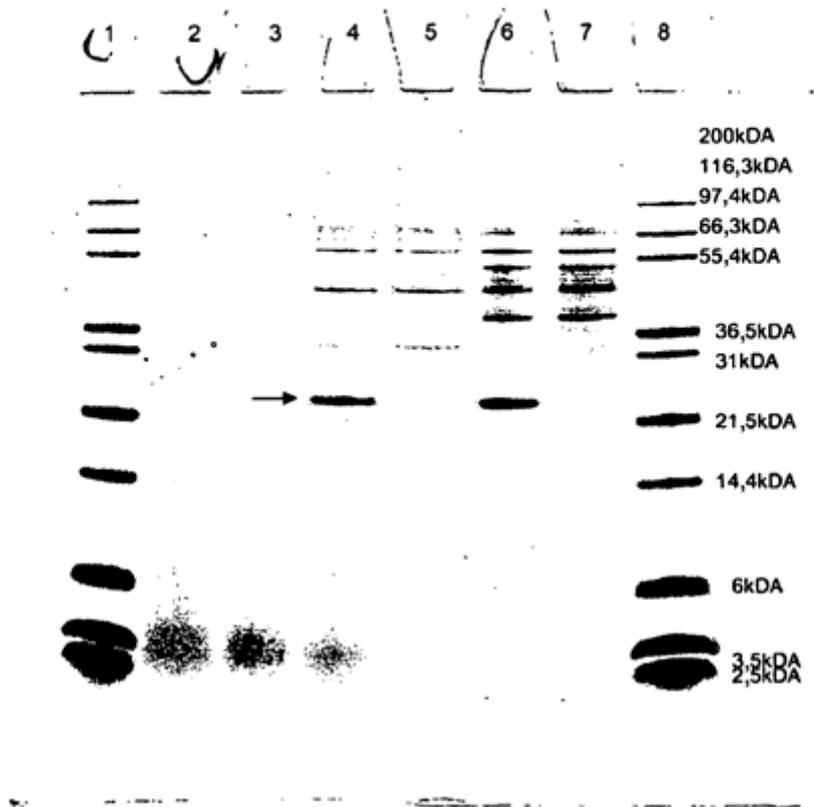
CATATGGCTCCGCCACGTCTGATTTGTGACTCTCGCGTTCTGGAGCGTTACCTGCTG  
GAGGCCAAGGAAGCCGAAAACATCACGACCGGTTGTGCGGAACATTGCTCTCTGAA  
TGAGAACATCACTGTTCCGGATACGAAGGTTAACTTCTACGCTTGGAAACGTATGGA  
AGTAGGCCAGCAGGCAGTAGAAGTGTGGCAGGGTCTGGCGCTGCTGTCCGAAGCG  
GTTCTGCGTGGCCAGGCGCTGCTGGTCAACTCCAGCCAGCCGTGGGAGCCGCTGC  
AGCTGCACGTAGATAAAGCGGTTAGCGGTCTGCGTTCCTGACTACCCTGCTGCGC  
GCGCTGGGTGCGCAAAAAGAAGCTATCTCCCCGCCAGATGCGGCATCTGCAGCCCC  
GCTGCGTACCATCACTGCAGATACTTTCCGCAAGCTGTTTCGTGTTTATTCCAATTC  
CTGCGTGGTAAACTGAAGCTGTACACCGGTGAAGCGTGCCGTACCGGCGATCGTTA  
ATAAACTCGAG

Figura 7

Secuencia de L-2- haloalcanoato deshalogenasa (hadL) (SED ID NO 26)

CATATGAAGGAAATAACCAATGAAAAACATCCAAGGTATCGTTTTCGATTTGTATGGC  
ACGCTCTACGACGTGCATTCCGTGGTGCAAGCCTGTGAAGAGGTCTATCCGGGCCA  
AGGCGACGCTATTTCTCGCCTCTGGCGGCAAAGCAATTGGAATACACCTGGCTCAG  
GAGCCTCATGGGCCGTTACGTGAACTTTGAGAAAGCAACAGAGGATGCCTTGCGCTT  
TACCTGCACGCATCTGGGCTTGTCGCTCGATGATGAAACCCACCAGCGCCTCAGTG  
ATGCTTATTTGCACCTCACCCCTTATGCCGATACAGCTGACGCCGTTTCGCCGTTTGA  
AAGCTGCGGGCCTACCGCTAGGCATCATTTCAAATGGTTCTCATTGCTCGATCGAGC  
AAGTCGTGACTAACTCTGAAATGAATTGGGCGTTCGATCAGCTGATCAGCGTCGAGG  
ATGTGCAAGTGTTCAAACCTGATAGTCGCGTCTATAGCCTTGCCGAGAAGCGCATGG  
GTTTTCAAAGGAAAACATCCTCTTCGTTTCGTCAAACGCGTGGGATGCGAGTGCAG  
CCAGTAACTTTGGTTTCCCGTTTGCTGGATCAATCGGCAGAACGGCGCGTTTGATG  
AGCTGGATGCAAAGCCGACACACGTCGTGCGTAATCTCGCCGAAATGTCGAACTGG  
CTGGTTAATTCGCTCGATTAATGAAGGATCC

Figura 8



La flecha indica la posición para la proteína HadL

Carril 1: Marcadores de peso molecular

Carril 2: Matraz 1 - CLD075 antes de la inducción

Carril 3: Matraz 2 - CLD075 antes de la inducción

Carril 4: Matraz 1 - CLD075, 6 h de cultivo, 3 h tras la inducción con IPTG 0,5 mM

Carril 5: Matraz 2 - CLD075, 6 h de cultivo, sin inducción.

Carril 6: Matraz 1 - CLD075, 23 h de cultivo, 20 h tras la inducción con IPTG 0,5 mM

Carril 7: Matraz 2 - CLD075, 23 h de cultivo, sin inducción.

Carril 8: Marcadores de peso molecular

Figura 9

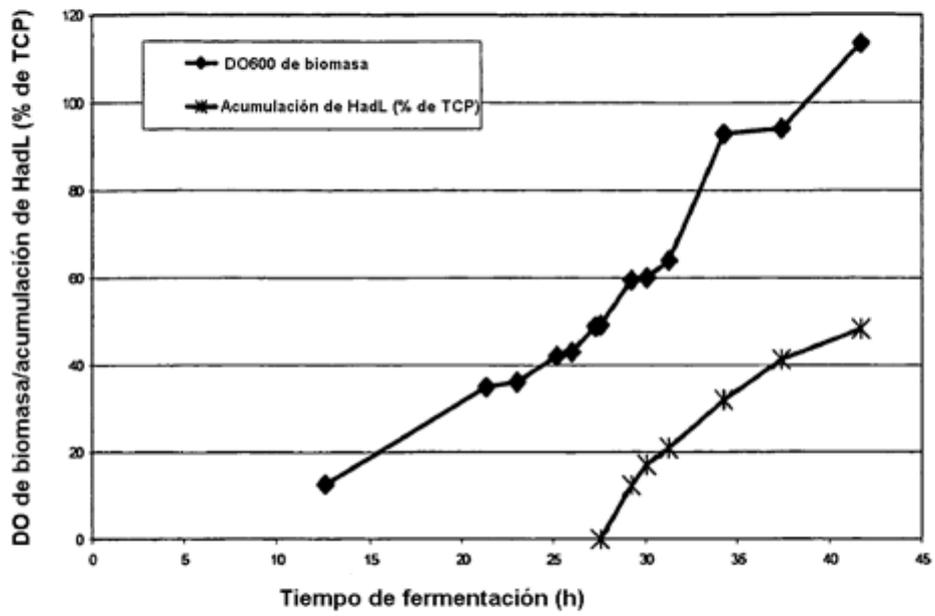
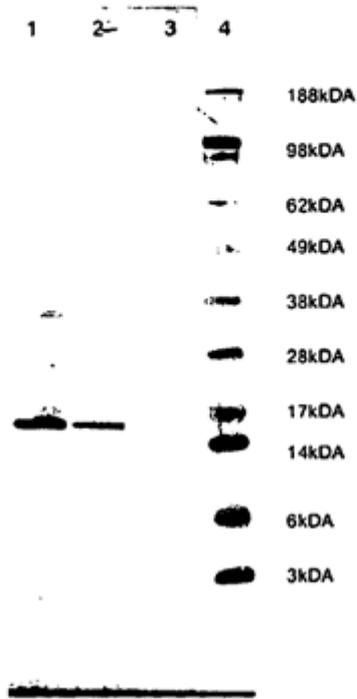


Figura 10



Carril 1: CLD077 20 h tras la inducción  
Carril 2: CLD077 3 h tras la inducción  
Carril 3: CLD077 antes de la inducción  
Carril 4: Marcadores de peso molecular

Figura 11. Mapa de plásmido para pAVE013

