

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 173**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 15/72** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2007 E 11171994 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2386642**

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:

**28.02.2014**

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, BHUPENDRA VALLABH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 445 173 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

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

5 Desde la patente US 6.537.779 se conocen sistemas de expresión de proteínas basados en secuencias operadoras palindrómicas perfectas basadas en T7. 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 el corte 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.

15 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 conducir 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.

Lanzer et al, Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 85, p. 8973-7 (1988) describe la influencia de la localización del operador lac sobre la represión de diversos promotores. Becker et al, J. Molecular Biology, Vol. 349, nº 4, p. 716-30 (2005) describe que la naturaleza, localización y de operadores desempeñan un papel en la formación de bucles de represión. Edamatsu et al, Gene, Vol. 187, nº 2, p. 289-94 (1997) describe una expresión de mamífero que comprende tres operadores lac en dirección 3' del promotor *EF-1 $\alpha$*  humano. Brosius et al, Proc. Nat. Acad. Sci. vol. 81, Vol. 81, p. 6929-33 (1984) describe la regulación de promotores de ARN ribosómico con un operador lac sintético. Savochina et al, Molecular & General Genetics, Vol. 189, nº 1 p. 142-7 (1983) describe aspectos de estabilidad plasmídica de la clonación de los promotores del fago T7 T7A1, T7A2 y T7A3 en tándem en plásmidos. Chidgeavadze et al, Nucleic Acids Research, Vol. 12, nº 3, p. 1671-86 (1984) describe que 2,3'-didesoxi-3'-aminonucleósido-5'-trifosfatos son terminadores de la síntesis de ADN catalizada por ADN polimerasas.

Existe un gran número de sistemas de expresión de proteínas heterólogos 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 enormemente empírico. Esto requiere mucho tiempo y no es deseable. 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.

Según la presente invención, se proporciona un sistema de expresión de proteínas que comprende:

- 40 a) un promotor T7A3; y  
b) una secuencia operadora palindrómica perfecta.

Las secuencias operadoras que pueden emplearse en el sistema de expresión según la presente invención incluyen lac, gal, deo y gln. Se pueden emplear una o más secuencias operadoras palindrómicas perfectas. En muchas realizaciones preferidas, se emplean dos secuencias operadoras palindrómicas perfectas, más ventajosamente una secuencia operadora que está situada en dirección 3' del promotor, y estando situada una secuencia operadora en dirección 5' del promotor. Cuando se emplean dos sistemas de operador, las secuencias operadoras están preferiblemente separadas para maximizar el control del promotor. En muchas realizaciones, la separación es de de 85 a 150 pares de bases, preferiblemente de 90 a 126 pares de bases, y lo más preferiblemente de 91 ó 92 pares de bases. En determinadas realizaciones, una secuencia operadora se solapa con el punto de inicio transcripcional.

50 Se reconocerá que el sistema operador se emplea comúnmente con una secuencia represora apropiada. Las secuencias represoras producen proteína represora, por ejemplo la secuencia génica lacI cuando se usan operadores 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 lac. La secuencia represora también puede proporcionarse mediante el genoma de célula huésped o mediante el uso de un plásmido compatible adicional.

55 El sistema de expresión puede estar integrado en el genoma de la 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 fágicos o virales, y éstos pueden 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 puede incorporar 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 tales 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 de pericia normal.

El sistema de expresión de la presente invención se puede emplear para expresar proteínas en células huésped, 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. La célula huésped puede ser procarionota o eucariota. Los ejemplos de células procarionotas 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*. Los ejemplos de células eucariotas incluyen levaduras, tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*. Las células huésped de mamífero que se pueden emplear incluyen estirpes celulares humanas, tales como células de riñón embrionario humano y PERC.6; estirpes celulares murinas, tales como células NS0; y particularmente estirpes celulares de hámster, tales como células de riñón de hámster neonato y especialmente células de ovario de hámster chino. También se pueden emplear otras células huésped eucariotas, tales como aquellas de hongos filamentosos, células vegetales, de insectos, de anfibios, o especies ovíparas. Las células huésped preferidas son bacterias, particularmente enterobacteriáceas, preferiblemente *E. coli*, y especialmente sus cepas B o K12.

El sistema de expresión de la presente invención se emplea comúnmente en forma de un plásmido, y los plásmidos que comprenden un promotor T7A3 y una secuencia operadora palindrómica perfecta 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 ventajosamente para la fabricación de proteínas, especialmente proteínas recombinantes, mediante el cultivo de células recombinantes. Para la expresión de proteínas, se reconocerá que el promotor y la secuencia operadora están operativamente unidos a ADN que codifica una proteína que va a expresarse.

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

- a) un promotor T7A3;
- b) una secuencia operadora palindrómica perfecta; y
- c) un casete de expresión para una proteína;

Si se desea, pueden estar presentes uno o más promotores, secuencias operadoras y cassetes de expresión, que pueden ser los mismos o diferentes.

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, los medios de crecimiento adecuados para células recombinantes dadas son bien conocidos.

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

#### 1. Generación de series de vectores pAVE

Vectores pAVE011, pAVE012 y pAVE013

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 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.

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

Oligonucleótido 1 (SEQ ID NO 1)

5'CATGTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCAAGAACAATCCTGCACG

Oligonucleótido 2.1 (SEQ ID NO 2)

5 5'AATTCGTGCAGGATTGTTCTTGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCCA

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

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

Oligonucleótido 3 (SEQ ID NO 3)

5'AATTCAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAATT  
GTGAGCGCTCACAATTCCCA

Oligonucleótido 4 (SEQ ID NO 4)

5'CTGGTGGGGGGTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCGTCGTGCCGT  
GTTTGCTTCGTGTTGTCCGGCCGTTTTGTTTG

15 ligándose los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y transformándose en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como un fragmento de Xba I/EcoR I. El cribado inicial se realizó mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. La secuencia se confirmó entonces mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE011.

20 Se clonó el gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como un fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE013. En la figura 7 se presenta un mapa de plásmido para pAVE013. Aquella 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 AVR), y un terminador de la transcripción de T4 en el sentido de 5'.

25 Vectores pAVE038 y pAVE041

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 en este plásmido un promotor tac y un operador lac nativo individual usando un ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

El ligador 1112 se obtuvo hibridando los oligonucleótidos 11 y 12

30 Oligonucleótido 11 (SEQ ID NO 5)

5'AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGGATACTGTGTGGAATT  
GTGAGCGGATAACAATTCCCA

Oligonucleótido 12 (SEQ ID NO 6)

5'CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAGTATCCGAGCC  
GATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTCAGAA

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

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

Vector pAVE028 y pAVE030

- 5 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.

Oligonucleótido 5 (SEQ ID NO 9)

**5'AATT CGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT  
TGTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

Oligonucleótido 6 (SEQ ID NO 10)

**5'CTGGTGGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCGTCGTGCCGT  
GTTTGCTTCGTGTTGTCTGGCCGTTTTGTTTCG**

- 10 ligándose los oligonucleótidos hibridados al plásmido pAVE012 y transformándose en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como un fragmento de Xba I/EcoR I. El cribado inicial se realizó mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. La secuencia se confirmó entonces mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE028.

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

- 15 Vectores pAVE007 y pAVE031

El vector de partida para la generación de pAVE007 fue pZT7#2.0, preparado tal como se describe en el documento US 6.537.779. Se clonaron en este plásmido un promotor T7A3 y un operador lac palindrómico perfecto individual usando un ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

El ligador que contiene el promotor T7A3 se obtuvo hibridando los oligonucleótidos 3 y 4.

- 20 Oligonucleótido 3 (SEQ ID NO 3)

**5'AATTCAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAATT  
GTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

Oligonucleótido 4 (SEQ ID NO 4)

**5'CTGGTGGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCGTCGTGCCGT  
GTTTGCTTCGTGTTGTCTGGCCGTTTTGTTTG**

- 25 Los oligonucleótidos 3 y 4 se hibridaron, el ligador formado se ligó entonces al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como un fragmento de Xba I/EcoR I. El cribado inicial se realizó mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. La secuencia se confirmó mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE007.

Se clonó un gen de TNF $\alpha$  humano en este plásmido como un fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE031.

Tabla 1: Resumen de vectores pAVE

Plásmido	Promotor	Sistema de operador	Comentarios
pAVE041	tac	Secuencia lac nativa individual	
pAVE013	T7A3	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador de 91 pares de bases (DPPS91)
pAVE030	T7A3	Secuencias palindrómicas perfectas dobles	Separación de operador 92 pares de bases (DPPS92)
pAVE031	T7A3	Secuencias palindrómicas perfectas individuales	

2. Generación de cepas recombinantes

5 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, USA) mediante electroporación con los plásmidos tal como se describen en la Tabla 2 a continuación. Las cepas recombinantes resultantes se purificaron y se mantuvieron en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

Tabla 2: Cepas recombinantes construidas

Huésped	Plásmido	Descripción (proteína:promotor:sistema de operador)	Nº de designación recombinante
ATCC27325	pAVE013	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS91	CLD018
ATCC27325	pAVE030	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS92	CLD026
ATCC27325	pAVE031	TNF $\alpha$ :T7A3:SPPS	CLD032
ATCC27325	pAVE041	TNF $\alpha$ :tac:lacO nativo individual	CLD043
BL21	pAVE013	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS91	CLD035
BL21	pAVE030	TNF $\alpha$ :T7A3:DPPS92	CLD028

Comparación 1

10 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.

El ligador 2122 se preparó hibridando los oligonucleótidos 21 y 22

Oligonucleótido 21 (SEQ ID NO 18)

15 **5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCCACATG  
AAACGACAGTGAGTCA**

Oligonucleótido 22 (SEQ ID NO 19)

**5'CTAGTGACTIONACTGTCGTTTTTCATGTGGTACCTCGTACCGTGTTTACTTCATGTTGTC  
AACCGTTTTGTTTCG**

20 El ligador se ligó entonces al plásmido pZT7#2.0, y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como un fragmento de Xba I/EcoR I. El cribado inicial se realizó mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. La secuencia se confirmó entonces mediante secuenciación. Se cribaron 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.

25 Comparación 2

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

30 El ligador 2324 se obtuvo hibridando los oligonucleótidos 23 y 24

Oligonucleótido 23 (SEQ ID NO 20)

**5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT  
TGTGAGCGGATAACAATTCCCCA**

Oligonucleótido 24 (SEQ ID NO 21)

**5'CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCGGTACATCGTACCGTGTTTACTTCA  
TGGTGTCAACCGTTTTGTTTCG**

5 El ligador se ligó entonces al plásmido pZT7#2.0, y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como un fragmento de Xba I/EcoR I. El cribado inicial se realizó mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. La secuencia se confirmó entonces 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 un fragmento de Nde I/Xho I. Se cribaron 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). Este plásmido se transformó en un huésped de producción (ATCC27325) y se volvió a secuenciar el plásmido.

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

### Ejemplo 3

20 Se retiró un vial de CLD032 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) suplementado con tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y glucosa (1 g/l). Se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu$ l 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). Los matraces se incubaron a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. El crecimiento se monitorizó hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto, un matraz se indujo con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,05 mM, mientras que el segundo matraz se dejó sin inducir para monitorizar la expresión basal. Se continuó la incubación, acumulación de hTNF $\alpha$  en las células bacterianas. El nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  se determinó usando barrido 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.

30 Tabla 3

Tiempo (horas)	Nivel de acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP*)
3	2
4	18
6	25
8	33
24	42
24 (basal, sin IPTG)	13

(\*): TCP = Proteína Celular Total

35 Tomados juntos, los datos presentados en las Comparaciones 1 y 2, y en el Ejemplo 3, muestran que se logró sorprendentemente el control eficaz del promotor T7A3 potente usando una secuencia operadora palindrómica perfecta individual. Esto fue totalmente inesperado dado que el uso del operador nativo individual (Comparación 2) no proporcionó control basal suficiente para permitir que se estableciese una cepa de producción recombinante estable. Se lograron niveles elevados de acumulación de producto con el sistema de control palindrómico perfecto individual usando concentración relativamente baja de inductor para la inducción. Aunque se observó expresión basal (en ausencia de inductor), fue evidente sólo tras incubación significativamente prolongada (24 h).

### Ejemplo 4

Se retiraron viales de CLD018 del congelador a -80°C y se dejaron descongelar. 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) suplementado con tetraciclina (10 µg/ml) y glucosa (1 g/l). El cultivo de siembra se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl 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). Los matraces se incubaron a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. El crecimiento se monitorizó hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto, los matraces se indujeron con IPTG (isopropil-β-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, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNF $\alpha$  en las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  usando barrido de densitometría de geles de 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 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 operadoras 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 fue 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, el control de la expresión basal se logró en un fondo elevado de ARN polimerasa de *E. coli*.

**Ejemplo 5**

Se retiró un vial de CLD026 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) suplementado con tetraciclina (10 µg/ml) y glucosa (1 g/l). Se incubó 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). Los matraces se incubaron a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. El crecimiento se monitorizó hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto, los matraces se indujeron con IPTG (isopropil-β-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, y acumulación de hTNF $\alpha$  en las células bacterianas. El nivel de acumulación de hTNF $\alpha$  se determinó usando barrido de densitometría de geles de SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

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 el cambio de la separación entre las dos secuencias operadoras palindrómicas perfectas en 1 pb (desde 91 hasta 92 pb) no influyó de manera adversa en el comportamiento tanto en términos de la expresión basal como en el nivel de acumulación final logrado. Inesperadamente, la reducción de la concentración de IPTG 10 veces (de 0,05 mM a 0,005 mM) no redujo significativamente la productividad inducida.

### Ejemplo 6

Se retiraron viales de CLD028 y CLD035 del congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se dejaron descongelar. Se inocularon por separado 10  $\mu\text{l}$  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) suplementado con tetraciclina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y glucosa (1 g/l). Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500  $\mu\text{l}$  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). Los matraces se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , a 200 rpm en un agitador orbital. El crecimiento se monitorizó hasta  $\text{DO}_{600}=0,5-0,7$ . En este punto, los matraces se indujeron con IPTG (isopropil- $\beta$ -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 hTNF $\alpha$  en las células bacterianas. La acumulación de hTNF $\alpha$  se determinó usando barrido de densitometría de geles de SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Los datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

CLD035: Promotor T7A3, operadores palindrómicos perfectos dobles con separación de 91 pb		CLD028: Promotor T7A3, operadores palindrómicos perfectos dobles con separación de 92 pb	
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*.

### Ejemplo 7

Se prepararon inóculos de fermentación añadiendo 200  $\mu\text{l}$  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) suplementado con 15  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina. Los inóculos se hicieron crecer durante 12 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en un agitador-incubador con una agitación de 250 rpm. Se usó inóculo del 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. Las fermentaciones se llevaron a cabo en las condiciones de funcionamiento descritas a continuación. Se controló la temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$  y 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 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 suplementación automática de oxígeno a la corriente de gas de entrada. El flujo de aire hacia la vasija de fermentador fue de 10 l/min. en todo momento. La presión se mantuvo en el fermentador entre 50 y 200 mbares.

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. La fermentación con alimentación discontinua se inició 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. La inducción se llevó a cabo mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM una vez que el nivel de la biomasa en la fermentación alcanzó  $\text{DO}_{600} = 50-60$ . La fase con alimentación discontinua se continuó durante 12 h tras la inducción. Se tomaron muestras para determinar el nivel de biomasa ( $\text{DO}_{600}$ ) y la acumulación de hTNF $\alpha$  (% de TCP)/título de hTNF $\alpha$  (g/l) en la cosecha (geles de 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
Acido 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 mg/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	114 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	29 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	17 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	9 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	4 mg/l
H <sub>3</sub> .BO <sub>3</sub>	12 mg/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

Los resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9

Cepa	Descripción del vector de expresión	DO <sub>600</sub> en la cosecha	Acumulación de hTNF $\alpha$ (% de TCP) en la cosecha	Título de hTNF $\alpha$ (mg/l) en la cosecha
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
CLD032	Promotor T7A3, secuencia palindrómica perfecta individual	194	41	12500

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

#### 5 Ejemplo 8

Se clonó el gen de fusión glutatión-S-transferasa-3C proteinasa (GST-3C) como un fragmento de Nde I/Xho I en pAVE011 digerido con Nde I y Xho I. La secuencia del inserto se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO 23). Los plásmidos recombinantes se cribaron mediante digestión de restricción, y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE052. Se transformó pAVE052 en BL21 de *E. coli* para obtener CLD054, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

Se clonó el gen de interferón  $\alpha 2$  (IFN $\alpha 2$ ) humano como un 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 2 (SEQ ID NO 24). Los plásmidos recombinantes se cribaron mediante digestión de restricción, y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE058. Se transformó pAVE058 en W3110 de *E. coli* para obtener CLD059, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

Se clonó el gen de eritropoyetina (EPO) humana, que se había sometido a optimización de codones para su expresión en *E. coli*, como un 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 3 (SEQ ID NO 25). Los plásmidos recombinantes se cribaron mediante digestión de restricción, y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE061. Se transformó pAVE061 en W3110 de *E. coli* para obtener CLD060, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C.

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. Las fermentaciones se mantuvieron 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). La fermentación con alimentación discontinua se inició 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 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 10. La fase con alimentación discontinua se continuó 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 producto de proteína (título de (GST-3C, IFN $\alpha 2$  y EPO) (g/l), usando geles de SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra).

Tabla 10

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 10 demuestran adicionalmente la utilidad de los sistemas para la fabricación de una amplia gama de proteínas heterólogas. Se logran títulos elevados de producto usando un procedimiento de fermentación genérico sencillo acoplado con manipulación de sólo la concentración de IPTG usada para la inducción. Esto es particularmente beneficioso para reducir los plazos de desarrollo del procedimiento para proteínas heterólogas terapéuticamente útiles.

#### 40 Ejemplo 9

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 4 (SEQ ID NO

26). El plásmido pAVE011 se digirió con Nde I y Spe I, y la banda se extrajo con gel. El gen hadL se digirió con Nde I y Spe I, y el gen hadL se extrajo con gel y se ligó a pAVE011 para producir pAVE075. El origen de replicación de *Pseudomonas savastanoi* se copió usando la PCR a partir de plásmido pCN60 (ATCC 77101; Nieto C, et al. (1990) Gene 87: 145-149).

5 Los cebadores usados fueron:

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

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

10 El producto de PCR se clonó inicialmente en TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen) y luego en pAVE075 mediante digestión con Bgl II. El plásmido resultante, pAVE086, se transformó 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 retiró un vial de CLD075 de un congelador a -80°C y se dejó descongelar. 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) suplementado con tetraciclina (10 µg/ml). Se incubó a 30°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl de este cultivo para inocular por separado dos matraces Erlenmeyer de 250 ml que  
15 contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Los matraces se incubaron a 30°C, a 200 rpm en un agitador orbital. El crecimiento se monitorizó hasta DO<sub>600</sub>=0,5-0,7. En este punto, un matraz se indujo 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 en las células bacterianas. El  
20 nivel de acumulación de HadL se determinó usando barrido de densitometría de geles de SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra.

La expresión y acumulación de la proteína HadL se presentan en la Figura 5. Los datos indican que el sistema de expresión de T7A3:DPSP91 funcionó en otro sistema de huésped procarionta. Sorprendentemente, el sistema de expresión funcionó con la misma eficacia en *Pseudomonas putida* que la observada cuando se usó *E. coli* como  
25 sistema huésped. No se detectó expresión basal incluso tras 23 h de incubación en ausencia de inductor. Se logró un nivel elevado de expresión y acumulación de proteína en *Pseudomonas putida* tras la inducción usando IPTG.

### Ejemplo 10

30 Se llevó a cabo una fermentación con alimentación discontinua usando CLD075 de *Pseudomonas putida* usando los medios de *E. coli* genéricos y las condiciones de procedimiento descritas en el Ejemplo 11. Las fermentaciones se mantuvieron a 30°C y pH 7,0 (controlado con hidróxido de amonio al 25% y ácido fosfórico al 10%). Se realizaron fermentaciones en modo discontinuo hasta agotamiento de la fuente de carbono (es decir, glicerol). La fermentación con alimentación discontinua se inició en este punto mediante adición de una alimentación que contenía glicerol (714 g/l) y sulfato de magnesio (30 g/l). Se llevó a cabo la inducción mediante adición de IPTG 1 mM (concentración final)  
35 una vez que el nivel de biomasa en la fermentación alcanzó DO<sub>600</sub> = 50. La fase con alimentación discontinua se continuó 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<sub>600</sub>) y la acumulación de proteína HadL ((% de TCP) geles de 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 6.

40 Se lograron niveles elevados 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*.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUJIFILM Diosynth Biotechnologies UK Limited

<120> Sistema de expresión

45 <130> SMC 60733/EPT/D1

<141> 2007-02-01

<150> GB 0602173.7

<151> 2006-02-03

<160> 40

50 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

- <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>
- 5 <223> oligonucleótido 1 usado en la preparación del Ligador 12.1  
 <400> 1  
 catgtgggaa ttgtgagcgc tcacaattcc aagaacaatc ctgcacg 47  
 <210> 2  
 <211> 47
- 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 2.1 usado en la preparación del Ligador 12.1  
 <400> 2
- 15 aattcgtca ggattgtct tggaattgtg agcgcacaca attccca 47  
 <210> 3  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 20 <220>  
 <223> oligonucleótido 3 usado en la clonación del promotor T7A3  
 <400> 3
- aattcaaca aaacggttga caacatgaag taaacacggt acgatgtacc ggaattgtga 60**  
**gcgctcacia ttcccca 77**
- <210> 4
- 25 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 4 usado en la clonación del promotor T7A3
- 30 <400> 4
- ctggtggggg gttgtgggcg ctgcggttc cgggtgcgctg tgccggtgtt gcttcggtt 60**  
**gtcggccggtt ttgtttg 77**
- <210> 5  
 <211> 79

ES 2 445 173 T3

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido 11 usado en la preparación del Ligador 1112		
5	<400> 5		
	<b>aat</b> tttctga <b>aat</b> gagctgt <b>tgaca</b> attaa <b>tcat</b> cggtc <b>ggata</b> ctgtg <b>tgga</b> attgtg	<b>60</b>	
	<b>agc</b> ggataac <b>aatt</b> cccca	<b>79</b>	
	<210> 6		
	<211> 79		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido 12 usado en la preparación del Ligador 1112		
	<400> 6		
	<b>ctagt</b> gggga <b>attgt</b> tatcc <b>gtcaca</b> aatt <b>ccaca</b> cagta <b>tccgag</b> ccga <b>tgatta</b> attg	<b>60</b>	
	<b>tcaac</b> agctc <b>attt</b> cagaa	<b>79</b>	
15	<210> 7		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> oligonucleótido 13 usado en la preparación del Ligador 1314		
	<400> 7		
	<b>aat</b> tttctga <b>aat</b> gagctgt <b>tgaca</b> attaa <b>tcat</b> cggtc <b>ggata</b> ctgtg <b>tgga</b> attgtg	<b>60</b>	
	<b>agc</b> gtcaca <b>att</b> cccca	<b>78</b>	
	<210> 8		
	<211> 78		
25	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido 14 usado en la preparación del Ligador 1314		
	<400> 8		
	<b>ctagt</b> gggga <b>attgt</b> gagcg <b>ctcaca</b> attc <b>caca</b> cagtat <b>ccgag</b> ccgat <b>gatta</b> attgt	<b>60</b>	
30	<b>caac</b> agctca <b>ttt</b> cagaa	<b>78</b>	

ES 2 445 173 T3

<210> 9  
 <211> 78  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido 5 usado en la clonación del promotor T7A3  
 <400> 9

**aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60**  
**agcgctcaca attcccca 78**

<210> 10  
 10 <211> 78  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 6 usado en la clonación del promotor T7A3  
 15 <400> 10

**ctggtggggg gttgtgggcg ctgcggttc cggtgcgtcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60**  
**gtcggccggt ttgtttcg 78**

<210> 11  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 7 usado en la preparación del Ligador 78  
 <400> 11

**aattatctct ggcggtgttg acataaatac cactggcggg gatactgagc ggaattgtga 60**  
**gcgctcacia ttcccca 77**

25 <210> 12  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> oligonucleótido 8 usado en la preparación del Ligador 78  
 <400> 12

ES 2 445 173 T3

	<b>ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg</b>	<b>60</b>
	<b>tcaacaccgc cagagat</b>	<b>77</b>
	<210> 13	
	<211> 77	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido 15 usado en la clonación del promotor tac	
	<400> 13	
	<b>aattcctgaa atgagctggt gacaattaat catcggtcgc tataatgtgt ggaattgtga</b>	<b>60</b>
	<b>gcgctcaciaa ttcccca</b>	<b>77</b>
10	<210> 14	
	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido 16 usado en la clonación del promotor tac	
	<400> 14	
	<b>ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt</b>	<b>60</b>
	<b>caacagctca tttcagg</b>	<b>77</b>
	<210> 15	
	<211> 33	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido 19 usado en la preparación del Ligador EcoR I	
	<400> 15	
25	<b>aattcaccgg tgtacagta tgtacaaccg gtc 33</b>	
	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido 20 usado en la preparación del Ligador EcoR I	



ES 2 445 173 T3

<400> 16

aattcaccgg ttgtacatga ctgtacaccg gtg 33

<210> 17

<211> 1550

5 <212> ADN

<213> *Murinae gen. sp.*

<400> 17

catatgaaat	acctattgcc	tacggcagcc	gctggattgt	tattactcgc	tgcccaacca	60
gcgatggccc	aggatgcagct	gcaggagtca	ggacctggcc	tggtggcgcc	ctcacagagc	120
ctgtccatca	catgcaccgt	ctcagggttc	tcattaaccg	gctatggtgt	aaactgggtt	180
cgccagcctc	caggaaagg	tctggagtgg	ctgggaatga	tttgggtga	tggaaacaca	240
gactataatt	cagctctcaa	atccagactg	agcatcagca	aggacaactc	caagagccaa	300
gttttcttaa	aaatgaacag	tctgcacact	gatgacacag	ccaggtaacta	ctgtgccaga	360
gagagagatt	ataggcttga	ctactggggc	caagggacca	cggtcaccgt	ctcctcagcc	420
tccaccaagg	gcccacgggt	cttccccctg	gcacctctct	ccaagagcac	ctctgggggc	480
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	600
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgactgtg	ccctccagta	gcttgggcac	ccagacctac	660
atctgcaacg	tgaatcacia	ccccagcaac	accaaggctg	acaagaaagt	tgagcccaaa	720
tcttcaacta	agacgcacac	atcaggaggt	gaacagaagc	tcattctcaga	agaggatctg	780
aattaataag	ggagcttgca	tgcaaattct	atttcaagga	gacagtcata	atgaaatacc	840
tattgcctac	ggcagccgct	ggattgttat	tactcgtctg	ccaaccagcg	atggccgaca	900
tcgagctcac	ccagtctcca	gcctcccttt	ctgcgtctgt	gggagaaact	gtcaccatca	960
catgtcgagc	aagtgggaat	attcacaatt	atttagcatg	gtatcagcag	aaacagggaa	1020
aatctcctca	gctcctggtc	tattatacaa	caaccttagc	agatggtgtg	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	aaggtggata	acgccctcca	atcgggtaac	tcccaggaga	1380
gtgtcacaga	gcaggacagc	aaggacagca	cctacagcct	cagcagcacc	ctgacgctga	1440
gcaaagcaga	ctacgagaaa	cacaaagtct	acgcctgcga	agtcacccat	cagggcctga	1500
gttcgcccgt	cacaaagagc	ttcaaccgcg	gagagtcata	gtaaggatcc		1550

<210> 18

ES 2 445 173 T3

	<211> 72		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> oligonucleótido 21 usado en la preparación del Ligador 2122		
	<400> 18		
	<b>aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cacatgaaac</b>	<b>60</b>	
	<b>gacagtgagt ca</b>	<b>72</b>	
	<210> 19		
	<211> 72		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido 22 usado en la preparación del Ligador 2122		
	<400> 19		
	<b>ctagtgactc actgtcgttt catgtggtac ctcgtaccgt gtttacttca tgttgtaaac</b>	<b>60</b>	
15	<b>cgttttgttt cg</b>	<b>72</b>	
	<210> 20		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> oligonucleótido 23 usado en la preparación del Ligador 2324		
	<400> 20		
	<b>aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg</b>	<b>60</b>	
	<b>agcggataac aattcccca</b>	<b>79</b>	
	<210>21		
25	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido 24 usado en la preparación del Ligador 2324		
30	<400> 21		

ctagtgggga attggtatcc gtcacaatt ccggtacatc gtaccgtggt tacttcatgt 60

tgtcaaccgt tttgtttcg 79

<210> 22

<211> 1592

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica dianticoerpo tetravalente individual biespecifico producido en el Ejemplo 15

<400> 22

ES 2 445 173 T3

catatgaaaa agacagctat cgcgattgca gtggcactgg ctggtttcgc taccgtagct 60  
 caagcccagg tgcagctgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 120  
 tccatcacat gcaccgtctc agggttctca ttaaccggct atggtgtaaa ctgggttcgc 180  
 cagcctccag gaaagggctt ggagtggtct ggaatgattt ggggtgatgg aaacacagac 240  
 tataattcag ctctcaaate cagactgagc atcagcaagg acaactccaa gagccaagtt 300  
 ttcttaaaaa tgaacagtct gcacactgat gacacagcca ggtactactg tgccagagag 360  
 agagattata ggcttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420  
 accaagggcc catcgagcgc caaaaccacc ccggacatcg agctctccca gtctccagca 480  
 atcctgtctg catctccagg ggagaaggct acaatgactt gcagggccag ctcaagtgta 540  
 acttacattc actggtacca gcagaagcca ggatcctccc ccaaactctg gatttatgcc 600  
 acatccaacc tggcttctgg agtccctgct cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctct 660  
 tactctctca caatcagcag agtggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccaacat 720  
 tggagtagta aaccaccgac gttcgggtgga ggcaccaagc tcgagatcaa acggactgtg 780  
 cgcgccgatg ccgccccgac cgtgcagggt cagctgcagg aatctgggtg tggcttagtt 840  
 caacctgggt gttccctgag actctcctgt gcaacttctg ggttcacctt cactgattac 900  
 tacatgaact gggtcgccca gcctccagga aaggcacttg agtgggtggg ttttattgga 960  
 aacaaagcta atggttacac aacagagtac agtgcactct 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 ctgcgtctgt gggagaaact 1260  
 gtcaccatca catgtcgagc aagtgggaat attcacaatt atttagcatg gtatcagcag 1320  
 aaacagggaa aatctctca gctcctgggtc tattatacaa caaccttagc agatgggtgtg 1380  
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg 1440  
 caacctgaag cttttgggag ttattactgt caacatcttt ggagtactcc tcggacgttc 1500  
 ggtggagggg ccaagctcga gatcaaacgg actgtgggat ccgaacaaaa gctgatctca 1560  
 gaagaagacc taaactcatg ataagcggcc gc 1592

<210> 23

<211> 1237

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica proteina de fusión GST producida en el Ejemplo 16

<400> 23

ES 2 445 173 T3

catatgtccc ctatactagg ttattggaaa attaagggcc ttgtgcaacc cactcgactt 60  
 cttttggaat atcttgaaga aaaatatgaa gagcatttgt atgagcgcga tgaaggtgat 120  
 aaatggcgaa acaaaaagtt tgaattgggt ttggagtttc ccaatcttcc ttattatatt 180  
 gatggtgatg ttaaattaac acagtctatg gccatcatac gttatatagc tgacaagcac 240  
 aacatgttgg gtggttgtcc aaaagagcgt gcagagattt caatgcttga aggagcggtt 300  
 ttggatatta gatacgggtg ttcgagaatt gcatatagta aagactttga aactctcaaa 360  
 gttgattttc tttagcaagct acctgaaatg ctgaaaatgt tcgaagatcg tttatgtcat 420  
 aaaacatatt taaatggtga tcatgtaacc catcctgact tcatgttgta tgacgetctt 480  
 gatgttgttt tatacatgga cccaatgtgc ctggatgcgt tcccaaaatt agtttgtttt 540  
 aaaaaacgta ttgaagctat cccacaaaatt gataagtact tgaaatccag caagtatata 600  
 gcatggcctt tgcagggctg gcaagccacg tttggtggtg gcgaccatcc tccaaaatcg 660  
 gatctggttc cgcgtggatc cggaccaaac acagaatttg cactatccct gttaaggaaa 720  
 aacataatga ctataacaac ctcaaaggga gagttcacag ggttaggcat acatgatcgt 780  
 gtctgtgtga taccacaca cgcacagcct ggtgatgatg tactagtga 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 gtagcaccac cactaacaga 1080  
 atgattcgtt atgattatgc aacaaaaact gggcagtgtg gaggtgtgct gtgtgctact 1140  
 ggtaagatct ttggtattca tgttggcggg aatggaagac aaggattttc agctcaactt 1200  
 aaaaaaat attttgtaga gaaacaataa gaattcc 1237

<210> 24

<211> 513

<212> ADN

5 <213> Homosapiens

<400> 24

catatgatgt gtgatctgcc gcaaactcat agcctgggta gccgtcgac cctgatgctg 60  
 ctggcccaa tgcgccgtat ctccctgttc tctgtctga aagaccgcca tgactttggc 120  
 ttcccgcagg aagagttcgg taaccagttc caaaaggcag aaactatccc ggtactgcac 180  
 gaaatgattc aacagatttt taacctgttc agcactaaag actcctctgc tgcatgggac 240  
 gaaactctcc tggacaaatt ctacaccgaa ctgtaccagc aactgaacga cctggaagcc 300  
 tgcgtcatcc aggggtgttg cgtaaccgaa actccgctga tgaaagaaga ctccatcctg 360

ES 2 445 173 T3

gctgttcgca aatacttcca gcgtatcacc ctgtacctga aagagaagaa atacagcccg 420  
 tgcgcttggg aagttgtacg cgctgaaatc atgcgttcct tcagcctgtc cactaacctg 480  
 caagaatctc tgcgtagcaa agaataactc gag 513

<210> 25

<211> 517

<212> ADN

5 <213> Homosapiens

<400> 25

catatggctc cgccacgtct gatttgtgac tctcgcgttc tggagcgтта cctgctggag 60  
 gccaaaggaag ccgaaaacat cagcaccggt tgtgcggaac attgctctct gaatgagaac 120  
 atcactgttc cggatacgaa ggtaacttc tacgcttggg aacgtatgga agtaggccag 180  
 caggcagtag aagtgtggca gggctctggcg ctgctgtccg aagcggttct gcgtggccag 240  
 gcgctgctgg tcaactccag ccagccgtgg gagccgctgc 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

10 <212> ADN

<213> *Pseudomonas putida*

<400> 26

ES 2 445 173 T3

catatgaagg aaataaccaa tgaaaaacat ccaaggtatc gttttcgatt tgtatggcac	60
gctctacgac gtgcattccg tgggtgcaagc ctgtgaagag gtctatccgg gccaaaggcga	120
cgctatttct cgcctctggc ggcaaaagca attggaatac acctggctca ggagcctcat	180
gggccggttac gtgaactttg agaaagcaac agaggatgcc ttgctgttta cctgcacgca	240
tctgggcttg tcgctcgatg atgaaaccca ccagcgctc agtcatgctt atttgcacct	300
cacccttat gccgatacag ctgacgccgt tcgccgtttg aaagctgcgg gcctaccgct	360
aggcatcatt tcaaatgggt ctcattgctc gatcgagcaa gtcgtgacta actctgaaat	420
gaattgggcg ttcgatcagc tgatcagcgt cgaggatgtg caagtgttca aacctgatag	480
tcgctctat agccttgccg agaagcgcgt gggttttcca aaggaaaaca tcctcttcgt	540
ttcgtcaaac gcgtgggatg cgagtgcagc cagtaacttt ggtttcccgg tttgctggat	600
caatcggcag aacggcgcgt ttgatgagct ggatgcaaag ccgacacacg tcgtgcgtaa	660
tctcggcgaa atgtcgaact ggctgggtta ttcgctcgat taatgaagga tcc	713

<210> 27

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador F37A usado en el Ejemplo 17

<400> 27

agatctacgc ttatgggtgc cttcc 26

10 <210> 28

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador B29a usado en el Ejemplo 17

<400> 28

agatctaata cgcaaaccgc ctctcc 26

<210> 29

<211> 69

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido GalB1 usado en la preparación del Ligador GalB

<400> 29

	<b>aattcatacc ataagcctaa ttctacgaat tatkagagtt ctggttaccg gtgtaagcgc</b>	<b>60</b>
	<b>ttacactgt</b>	<b>69</b>
	<210> 30	
	<211> 69	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido GalB2 usado en la preparación del Ligador GalB	
	<400> 30	
	<b>ctagacagtg taagcgctta caccggtaac cagaactctg ataattcgta gaattaggct</b>	<b>60</b>
	<b>tatggtatg</b>	<b>69</b>
10	<210> 31	
	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido GalA1 usado en la preparación del Ligador GalA	
	<400> 31	
	<b>caattgtgta agcgcttaca caactttatt ccatgtcaca cttttcgcac ctttggtatg</b>	<b>60</b>
	<b>ctatggtg</b>	<b>68</b>
	<210> 32	
	<211> 72	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido GalA2 usado en la preparación del Ligador GalA	
	<400> 32	
	<b>aattcacat cgcataacaa ggatgcgaaa agtgtgacat ggaataaagt tgtgtaagcg</b>	<b>60</b>
25	<b>cttacacaat tg</b>	<b>72</b>
	<210> 33	
	<211> 438	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	



ES 2 445 173 T3

<223> secuencia que codifica el promotor hCMV y los operadores Lac usados en el Ejemplo 21

<400> 33

```

catatgccaa gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccc ctggcattat      60
gccagtaca tgaccttacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc     120
gctattatac catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga tagcggtttg     180
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc     240
aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta ataaccccc cccgttgacg caaatgggga     300
attgtgagcg ctcacaattc ctctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatca     360
ctagatgctg acagtcctgat gacttgcctg gaattgtgag cgctcacaat tccaagcttt     420
attgctgctg aggctagc                                     438
    
```

<210> 34

5 <211> 813

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica proteína IgG Fc usada en el Ejemplo 21

10 <400> 34

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgtaca agcttggatc cgcagagccc     120
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga     180
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt     240
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg     300
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac     360
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag     420
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     480
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag     540
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     600
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     660
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     720
cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     780
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga                                     813
    
```

<210> 35

<211> 1104

<212> ADN

ES 2 445 173 T3

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia clónica 1 usada en el Ejemplo 20

<400> 35

```

ctcgaggcat gtgctctgta tgtatataaa actcttggtt tcttcttttc tctaaatatt    60
ctttccttat acattaggac ctttgcagca taaattacta tacttctata gacacgcaaa    120
cacaataca cacactaaat ggcggagctg aattacattc ccaaccgctg ggcacaacaa    180
ctggcgggca aacagtcggt gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcacgcg    240
ccgtcgc aaa ttgtcgcggc gattaaatct cgcgccgatc aactgggtgc cagcgtgggtg    300
gtgtc gatg 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 gcgggccccat taagtctctgt ctcggcgcgt    600
ctgctctgctg ctggctggca taaatatctc actcgc aatc aaattcagcc gatagcggaa    660
cgggaaggcg actggagtgc catgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag    720
ggcatcgttc ccaactgcgat gctggttgcc aacgatcaga tggcgcctggg cgcaatgcgc    780
gccattaccg agtccgggct gcgcgttggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat    840
accgaagaca gctcatgtta tateccgccg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg    900
ctggggcaaaa ccagcgtgga ccgcttgctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc    960
aatcagcttt tgcccgtctc actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa   1020
accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagc tcgcacgaca ggtttcccga   1080
ctggaaagcg ggcagtgact cgag                                     1104

```

5

<210> 36

<211> 1026

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencia clónica 2 usada en el Ejemplo 20

<400> 36

ES 2 445 173 T3

ggatcctagg caataattat gagataaatg gtgcagcact attaagtagt gtggatttca 60  
 ataatttccg aattaggaat aaatgcgcta aatagacatc ccgttctctt tggtaatctg 120  
 cataattctg atgcaatatc caacaactat ttgtgcaatt atttaacaaa atccaattaa 180  
 ctttcctaata tagtccttca atagaacatc tgtattcctt tttttatga acaccttctt 240  
 aattaggcca tcaacgacag taaattttgc cgaatttaat agcttctact gaaaaacagt 300  
  
 ggaccatgtg aaaagatgca tctcatttat caaacacata atattcaagt gagccttact 360  
 tcaattgtat tgaagtgcaa gaaaacccaaa aagcaacaac aggttttggga taagtacata 420  
 tataagggaa ttgtgagcgc tcacaattcc tgttactggt cttacgattc atttacgatt 480  
 caagaatagt tcaaacaaga agattacaaa ctatcaatgg aattgtgagc gctcacaatt 540  
 ccaagaatga gatttccttc aatttttact gctgttttat tcgcagcatc ctccgcatta 600  
 gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgtc 660  
 atcggttact cagattttaga aggggatttc gatgttgctg ttttgccatt ttccaacagc 720  
 acaataaacg ggttattggt tataaatact actattgcca gcattgctgc taaagaagaa 780  
 ggggtatctc tcgagaaaag agaggctgaa gctgctcaag aaccagttaa aggtcctgtg 840  
 tctactaagc caggttcttg tcctattatc ttgatctggt gcgctatggt aaaccacct 900  
 aaccgttggt 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>

<223> oligonucleótido 17 usado en la clonación del promotor tac

<400> 37

aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggattgtg 60  
 agcgctcaca attcccca 78

10

<210> 38

<211> 78

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido 18 usado en la clonación del promotor tac

ES 2 445 173 T3

<400> 38

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt 60  
caacagctca tttcagaa 78

<210> 39

<211> 78

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 9 usado en la clonación del promotor pL lambda

<400> 39

aattcatctc tggcgggtgtt gacataaata ccactggcgg tgatactgag cgggaattgtg 60  
agcgctcaca attcccca 78

10

<210> 40

<211> 78

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido 10 usado en la clonación del promotor pL lambda

<400> 40

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg 60  
tcaacaccgc cagagatg 78

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de expresión de proteína, que comprende:
  - a) un promotor T7A3 ligado operablemente a
  - b) una secuencia operadora palindrómica perfecta.
- 5 2. Un vector que comprende:
  - a) un promotor T7A3 ligado operablemente a
  - b) una secuencia operadora palindrómica perfecta.
3. Un vector según la reivindicación 2, que comprende además un casete de expresión para una proteína.
- 10 4. Un vector según las reivindicaciones 2 ó 3, en el que el vector es un plásmido, preferiblemente un plásmido que se replica de forma autónoma.
5. Una célula huésped transformada mediante un vector como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. Un método para la producción de una proteína recombinante, que comprende expresar un sistema de expresión que comprende:
  - 15 a) un promotor T7A3; operablemente ligado a
  - b) una secuencia operadora palindrómica perfecta; y operablemente enlazada a
  - c) un casete de expresión para una proteína recombinante.
7. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sistema operador es lac, gal, deo o gln.
- 20 8. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se emplea una secuencia operadora palindrómica perfecta individual, que está situada preferiblemente en dirección 3' del promotor.
9. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el operador tiene la secuencia GGAATTGTGAGCGCTCACAATTCC (nucleobases 51 a 74 de SEC ID No. 3).
- 25 10. Un sistema de expresión, vector, células huésped o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que un operador solapa el punto de partida transcripcional.
11. Un método para producir una proteína, que comprende:
  - a) cultivar una célula huésped transformada con un vector según la reivindicación 3; y
  - b) recuperar la proteína.
- 30 12. Un método según la reivindicación 11, en el que la célula huésped es *E. coli*.
13. Un método según las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el vector es un vector como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que un operador solapa el punto de partida transcripcional.

Figura 1

Secuencia de la fusión GST-3C (SEC ID nº 23)

CATATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGAC  
 TTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGG  
 TGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTAT  
 TATATTGATGGTGATGTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGA  
 CAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGA  
 AGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT  
 GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCCGAAG  
 ATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATG  
 TTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCC  
 CAAAATTAGTTTGTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTG  
 AAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGT  
 GGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCGGACCAAACACAGA  
 ATTTGCACTATCCCTGTAAAGGAAAAACATAATGACTATAACAACCTCAAAGGGAGAG  
 TTCACAGGGTTAGGCATACATGATCGTGTCTGTGTGATACCCACACACGCACAGCCT  
 GGTGATGATGTACTAGTGAATGGTCAGAAAATTAGAGTTAAGGATAAGTACAAATTAG  
 TAGATCCAGAGAACATTAATCTAGAGCTTACAGTGTTGACTTTAGATAGAAATGAAAA  
 ATTCAGAGATATCAGGGGATTTATATCAGAAGATCTAGAAGGTGTGGATGCCACTTTG  
 GTAGTACATTCAAATAACTTTACCAACACTATCTTAGAAGTTGGCCCTGTAACAATGG  
 CAGGACTTATTAATTTGAGTAGCACCCCCACTAACAGAATGATTCGTTATGATTATGC  
 AACAAAACTGGGCAGTGTGGAGGTGTGCTGTGTGCTACTGGTAAGATCTTTGGTAT  
 TCATGTTGGCGGTAATGGAAGACAAGGATTTTCAGCTCAACTTAAAAACAATATTTT  
 GTAGAGAAACAATAAGAATTCC

Figure 2

Secuencia de interferón  $\alpha 2$  (SEC ID nº 24)

CATATGATGTGTGATCTGCCGCAAACCTCATAGCCTGGGTAGCCGTGCGACCCTGATG  
CTGCTGGCCCAAATGCGCCGTATCTCCCTGTTCTCCTGTCTGAAAGACCGCCATGAC  
TTTGGCTTCCCGCAGGAAGAGTTCCGGTAACCAGTTCAAAAGGCAGAACTATCCCG  
GTA CTGCACGAAATGATTCAACAGATTTTTAACCTGTT CAGCACTAAAGACTCCTCT  
GCTGCATGGGACGAAACTCTCCTGGACAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAACTG  
AACGACCTGGAAGCCTGCGTCATCCAGGGTGTGGCGTAACCGAAACTCCGCTGAT  
GAAAGAAGACTCCATCCTGGCTGTTCCGCAAATACTTCCAGCGTATCACCTGTACCT  
GAAAGAGAAGAAATACAGCCCGTGCGCTTGGGAAGTTGTACGCGCTGAAATCATGC  
GTTCTTCAGCCTGTCCACTAACCTGCAAGAATCTCTGCGTAGCAAAGAATAACTCG  
AG

5 Figura 3

Secuencia de eritropoyetina (EPO) (SEC ID nº 25)

CATATGGCTCCGCCACGTCTGATTTGTGACTCTCGCGTTCTGGAGCGTTACCTGCTG  
GAGGCCAAGGAAGCCGAAAACATCACGACCGGTTGTGCGGAACATTGCTCTCTGAA  
TGAGAACATCACTGTTCCGGATACGAAGGTTAACTTCTACGCTTGGAAACGTATGGA  
AGTAGGCCAGCAGGCAGTAGAAGTGTGGCAGGGTCTGGCGCTGCTGTCCGAAGCG  
GTTCTGCGTGGCCAGGCGCTGCTGGTCAACTCCAGCCAGCCGTGGGAGCCGCTGC  
AGCTGCACGTAGATAAAGCGGTTAGCGGTCTGCGTTCCTGACTACCCTGCTGCGC  
GCGCTGGGTGCGCAAAAAGAAGCTATCTCCCCGCCAGATGCGGCATCTGCAGCCCC  
GCTGCGTACCATCACTGCAGATACTTCCGCAAGCTGTTTCGTGTTTATTCAACTTC  
CTGCGTGGTAAACTGAAGCTGTACACCGGTGAAGCGTGCCGTACCGGCGATCGTTA  
ATAAACTCGAG

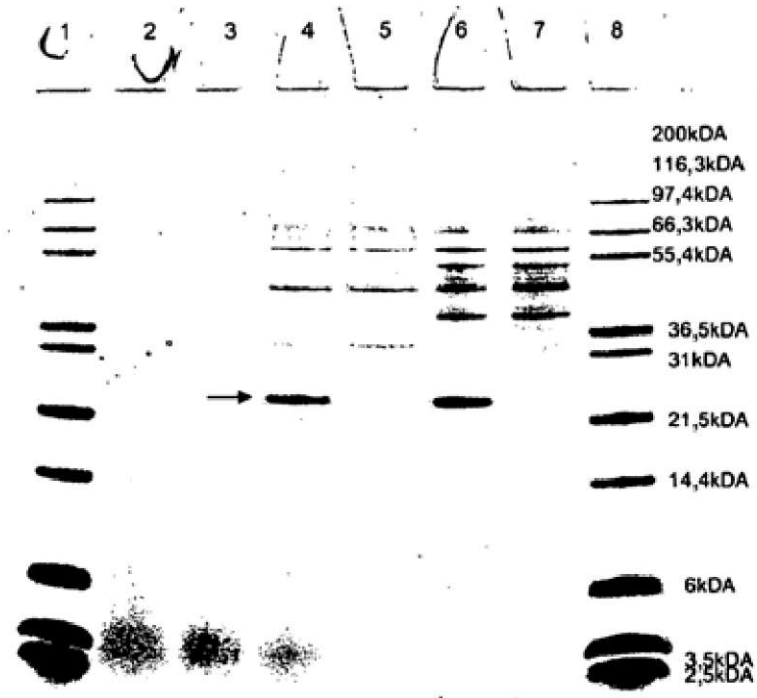
Figura 4

Secuencia de L-2-haloalcanoato deshalogenasa (hadL) (SEC ID nº 26)

CATATGAAGGAAATAACCAATGAAAAACATCCAAGGTATCGTTTTCGATTTGTATGGC  
ACGCTCTACGACGTGCATTCCGTGGTGCAAGCCTGTGAAGAGGTCTATCCGGGCCA  
AGGCGACGCTATTTCTCGCCTCTGGCGGCCAAAAGCAATTGGAATACACCTGGCTCAG  
GAGCCTCATGGGCCGTTACGTGAACTTTGAGAAAGCAACAGAGGATGCCTTGCGCTT  
TACCTGCACGCATCTGGGCTTGTCGCTCGATGATGAAACCCACCAGCGCCTCAGTG  
ATGCTTATTTGCACCTCACCCCTTATGCCGATACAGCTGACGCCGTTTCGCCGTTTGA  
AAGCTGCGGGCCTACCGCTAGGCATCATTTCAAATGGTTCTCATTGCTCGATCGAGC  
AAGTCGTGACTAACTCTGAAATGAATTGGGCGTTCGATCAGCTGATCAGCGTCGAGG  
ATGTGCAAGTGTTCAAACCTGATAGTCGCGTCTATAGCCTTGCCGAGAAGCGCATGG  
GTTTTCCAAAGGAAAACATCCTCTTCGTTTCGTCAAACGCGTGGGATGCGAGTGCAG  
CCAGTAACTTTGGTTTCCCGTTTGCTGGATCAATCGGCAGAACGGCGCGTTTGATG  
AGCTGGATGCAAAGCCGACACACGTCGTGCGTAATCTCGCCGAAATGTCGAACTGG  
CTGGTTAATTCGCTCGATTAATGAAGGATCC



Figura 5



La flecha indica la posición para la proteína HadL

Línea 1: Marcadores de peso molecular

Línea 2: Matraz 1 – pre-inducción de CLD075

Línea 3: Matraz 2 - pre-inducción de CLD075

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

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

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

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

Línea 8: Marcadores de peso molecular

Figura 6

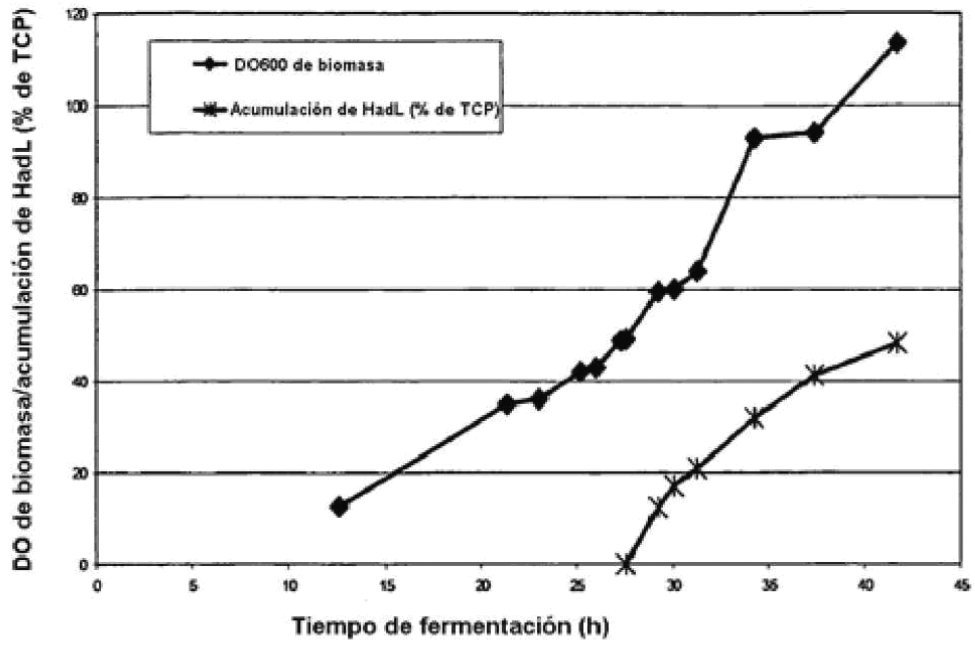


Figura 7. Mapa de plásmido para pAVE013

