

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 877**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11745810 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2598516**

54 Título: **Procedimiento para purificar proteínas**

30 Prioridad:

27.07.2010 GB 201012599

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

15.06.2015

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
60, Allee de la Recherche
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

WILD, GAVIN BARRY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 877 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

Procedimiento para purificar proteínas

Esta invención se refiere a un procedimiento para purificar una proteína recombinante procedente de una muestra de células hospedadoras gram-negativas o de su extracto. Más específicamente, la muestra de células
 5 hospedadoras gram-negativas o su extracto se ajusta a un pH bajo para efectuar la precipitación de la proteína disulfuro isomerasa.

Se han desarrollado rápidamente técnicas de ADN recombinante y son particularmente útiles en la producción de anticuerpos, en particular de anticuerpos terapéuticos. Los sistemas para la expresión de genes recombinantes son bien conocidos por el experto en la técnica en el campo en cuestión. Estos incluyen la expresión en células de
 10 mamífero, células de insectos, células micóticas, células bacterianas y animales y plantas transgénicos. La elección del sistema de expresión depende de las características de la proteína codificada, por ejemplo las modificaciones tras la traducción. Otras consideraciones incluyen el tiempo y, en particular, el coste implicado en la producción de la cantidad deseada de material de la calidad requerida. Estas últimas consideraciones son particularmente importantes en la producción de anticuerpos terapéuticos de la calidad requerida para la aprobación reglamentaria y
 15 en las cantidades necesarias para el tratamiento de un gran número de pacientes.

Un sistema ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes se basa en la expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*). Un problema específico encontrado con la utilización de *E. coli* es la dificultad de producir material de la calidad requerida en cantidades necesarias para tratamiento. En particular, el tiempo y los costes implicados pueden ser prohibitivos. Un problema específico a destacar es la pérdida incurrida en el rendimiento de
 20 anticuerpos durante la purificación de los anticuerpos de *E. coli*.

Aunque, proporcionalmente, los costes de purificación son una fracción del coste total de un producto de anticuerpo terapéutico, la proporción del coste de purificación aumentará más a medida que los costes de producción aguas arriba sean más económicos. Por lo tanto, las mejoras en la recuperación y purificación de anticuerpos conducirán a costes de producción más hacia abajo con independencia de los medios de producción (Humphreys & Glover, *Curr. Opin. Drug Discovery & Development*, 20014:172-185). Por consiguiente, hay necesidad de métodos que introduzcan ahorros de tiempo y/o de costes en la producción de anticuerpos terapéuticos y, en particular, en la purificación, por ejemplo aumentando la recuperación de productos y/o mejorando la calidad de la corriente del
 25 producto.

El bajo rendimiento en productos es con frecuencia un problema específico observado durante las etapas de purificación aguas abajo. Un problema específico en la purificación aguas abajo se refiere a la separación de proteínas de células hospedadoras (PCH) que se liberan tras la extracción del anticuerpo terapéutico de las células hospedadoras. Numerosas modificaciones del procedimiento se han intentado con objeto de estudiar este problema. Ejemplos de dichos procedimientos comprenden los siguientes:

La proteína de interés puede precipitarse y separarse a continuación de otros contaminantes de las PCH. Sin embargo, la precipitación de un anticuerpo terapéutico puede producir daño irreversible al anticuerpo. Las técnicas que precipitan específicamente la proteína de interés con frecuencia producen la oclusión de los contaminantes no proteicos en el precipitado, haciendo la separación ineficaz.

Alternativamente, las PCH pueden precipitarse fuera del anticuerpo terapéutico. El documento US7169908 describe la adición de una solución de lactato de etacridina para precipitar impurezas de células hospedadoras. Sin embargo, la utilización de un agente tal como lactato de etacridina no es adecuada para la producción de proteínas terapéuticas porque se ha utilizado como agente abortivo y puede ser perjudicial para el paciente si no se elimina completamente. Las PCH de un cultivo celular CHO se han precipitado utilizando una pequeña molécula y ajuste de pH con objeto de purificar una proteína (Arunakumari A. *et al.* *Advances in Non-Protein A Purification Processes for Human Monoclonal Antibodies Supplement to BioPharm International* marzo de 2009 págs. 22-26).

HU *et al.*: "Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support", *Protein Expression and Purification*, vol. 52, nº 1, 8 de enero de 2007, páginas 194-201 y HU *et al.*: "Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, vol. 120, nº 1, 17 de octubre de 2005, páginas 38-45, describen un método para purificar una proteína recombinante procedente
 40 de una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas en donde dicha célula hospedadora expresa un fragmento scFv de anticuerpo monocatenario recombinante y una disulfuro isomerasa recombinante DsbC para aumentar el rendimiento de la proteína diana recombinante. Sin embargo, ambos documentos no describen el ajuste del pH de la muestra de células hospedadoras a un pH de 5 o menos para precipitar la disulfuro isomerasa recombinante antes del tratamiento ulterior.

Mientras dichos métodos han contribuido a ayudar a purificar anticuerpos terapéuticos de contaminantes de células hospedadoras existe todavía una necesidad de proporcionar mejores métodos para reducir la cantidad de PCH de los sistemas de células hospedadoras microbianas sin afectar negativamente las propiedades del anticuerpo terapéutico con objeto de facilitar el ulterior tratamiento aguas abajo.

Además los inventores han descubierto que la expresión de algunas proteínas chaperonas, por ejemplo una disulfuro isomerasa, tal como DsbC, por el hospedador puede ser útil en el aumento de los niveles de expresión de anticuerpos o de uno de sus fragmentos. Sin embargo, la proteína chaperona se expresa a niveles significativos y llega a ser un gran subproducto del procedimiento que requiere eliminación.

- 5 Eliminar grandes cantidades de contaminantes puede ser desafiante porque métodos tales como la cromatografía en columna encuentran dificultades para eliminar grandes cantidades de una proteína contaminante debido al ensuciamiento de la columna y la necesidad de utilizar grandes cantidades de reactivos o disolventes.

Cuando la DsbC está aislada se prueba que es soluble a pH bajos tales como pH 3. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el ajuste de pH de 5 o menos puede utilizarse para precipitar

10 disulfuro isomerasa recombinante de una célula hospedadora bacteriana gram-negativa y de este modo facilitar el ulterior tratamiento de una proteína recombinante de interés, tal como un anticuerpo terapéutico.

Compendio de la Invención

- En uno aspecto se proporciona un método para purificar una proteína recombinante procedente de una célula hospedadora, por ejemplo una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas que expresan una
- 15 proteína recombinante y una disulfuro isomerasa recombinante o de un extracto de la misma; que comprende:

- a. ajustar el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma a un pH de 5 o inferior para precipitar la disulfuro isomerasa recombinante; y
- b. separar la disulfuro isomerasa recombinante precipitada de la proteína recombinante para proporciona una muestra de proteína recombinante.

- 20 La presente invención proporciona además la utilización de una etapa de ajuste del pH de una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas transformadas con un vector de expresión que codifica una proteína recombinante o de un extracto de la misma a un pH de 5 o inferior para precipitar disulfuro isomerasa recombinante de célula hospedadora, seguida de separación de la disulfuro isomerasa recombinante de la célula hospedadora precipitada procedente de la proteína recombinante y proporciona una muestra de proteína recombinante purificada.

- 25 En una realización se proporciona un método para purificar un anticuerpo recombinante o uno de sus fragmentos de fijación procedente de una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas o un extracto de dichas células hospedadoras en donde dichas células hospedadoras expresan el anticuerpo recombinante o uno de sus fragmentos de fijación y una disulfuro isomerasa recombinante DsbC; en donde el método comprende:

- a. ajustar el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma a un pH de 3,5 a 5 para

30 precipitar la DsbC recombinante; y

- b. separar la DsbC recombinante precipitada para proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo recombinante purificado o uno de sus fragmentos.

- Sorprendentemente esta etapa de ajuste de pH precipita una cantidad significativa de la disulfuro isomerasa recombinante de células hospedadoras de la solución y de este modo permite la separación de la disulfuro
- 35 isomerasa recombinante de células hospedadoras de la proteína recombinante de interés. Esto facilita el tratamiento aguas abajo, sobre todo cualesquiera de las etapas cromatográficas posteriores tal como la captura cromatográfica no de afinidad, al reducir la disulfuro isomerasa de la célula hospedadora en la solución compitiendo con la proteína recombinante por los puntos de fijación en la columna cromatográfica. Por consiguiente, la carga de PCH en la columna de cromatografía se minimiza y el rendimiento de la proteína recombinante de interés se mejora cuando se
- 40 utilizan el mismo tamaño y número de columnas de cromatografía. Esto reduce el tiempo y el coste de la ulterior purificación aguas abajo.

- Curiosamente la DsbC pura no precipita a un pH en el intervalo de 3,0 a 5 (véase la figura 4). Sin embargo, cuando está presente en el medio del complejo de una célula gram-negativa que expresa un anticuerpo o uno de sus fragmentos de fijación o alternativamente en presencia de parte o todo el contenido de dichas células entonces la
- 45 DsbC precipita. Aunque no se desea estar ligado por la teoría se supone que el medio de la matriz del complejo de la célula hospedadora o de su extracto cataliza la precipitación de la disulfuro isomerasa, como por ejemplo DsbC, en el intervalo de pH aún cuando normalmente la proteína es soluble a un pH en el intervalo de 3,5 a 5. Quizás una vez se inicia la precipitación continúa y se intensifica.

- Por lo tanto, el método según la presente descripción es adecuado para su utilización a gran escala y por
- 50 consiguiente es muy útil en el tratamiento comercial de proteínas tal como anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta la precipitación observada de la solución de células hospedadoras una vez el pH se ha ajustado a pH 5,0, pH 4,5 o pH 3,0 en comparación con el pH de referencia de 6,9.

La figura 2 presenta el cromatograma de un análisis de HPLC en fase inversa en el momento (T) = 0 para soluciones de células hospedadoras tras el ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 o pH 3 en comparación con el pH de referencia de 7.

La figura 3 presenta los distintos cromatogramas de un análisis de HPLC en fase inversa en el momento T= 0 para soluciones de células hospedadoras tras el ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 o pH 3 en comparación con el pH de referencia de 7.

La figura 4 presenta los distintos cromatogramas de un análisis de HPLC en fase inversa para una solución que comprende DsbC tras el ajuste de pH a pH3 después de diferentes intervalos de tiempo en comparación con el pH de referencia de 7.

La figura 5 presenta el área del pico total de un análisis de HPLC en fase inversa en varios puntos de tiempo para soluciones de células hospedadoras tras el ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 o pH 3 en comparación con el pH de referencia de 7.

La figura 6 presenta el área del pico total para PDB de un análisis de HPLC en fase inversa en varios puntos de tiempo para soluciones de células hospedadoras tras el ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 o pH 3 en comparación con el pH de referencia de 7.

La figura 7 presenta el análisis en gel SDS-PAGE para soluciones de células hospedadoras tras el ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 o pH 3 en comparación con el pH de referencia de 6,9.

La figura 8 presenta las secuencias SEQ. ID. n° 1 a n° 16.

La figura 9 muestra la estructura de un compuesto denominado CDP870 que comprende un fragmento Fab anti-FNT modificado unido por enlace covalente a un conector de lisil-maleimida en donde cada grupo amino en el resto lisilo tiene unido por enlace covalente a él un resto metoxi-PEG en donde n es aproximadamente 420.

Breve descripción de las secuencias

SEQ. ID. n°: 1 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCH1 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 2 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCH2 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 3 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCH3 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 4 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCL1 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 5 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCL2 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 6 presenta la secuencia de aminoácidos de RDCL3 de CDP870.

SEQ. ID. n°: 7 presenta las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas de la zona variable CDP870 de cadena ligera.

SEQ. ID. n°: 8 presenta las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas de la zona variable CDP870 de cadena pesada.

SEQ. ID. n°: 9 presenta la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera CDP870 injertada con Fab anti-FNT α .

SEQ. ID. n°: 10 presenta la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada CDP870 injertada con Fab anti-FNT α de.

SEQ. ID. n°: 11 es la secuencia de nucleótidos de DsbC marcada con his.

SEQ. ID. n°: 12 es la secuencia de aminoácidos de DsbC marcada con his.

SEQ. ID. n°: 13 es la secuencia del gen spr natural incluida la secuencia señal que son los restos de los primeros 26 aminoácidos.

SEQ. ID. n°: 14 es la secuencia del gen spr natural sin la secuencia señal.

SEQ. ID. n°: 15 es la secuencia de ADN de un gen Tsp transgénico mutado incluidos los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codon de inicio.

SEQ. ID. n°: 16 presenta la secuencia 2 intergénica (IGS2) que codifica la casete oligonucleotídica para la expresión de Fab de *E. coli*.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La presente invención se describe a continuación con más detalle.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se emplean indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto lo indique de otra manera. "Péptido" tiene por objeto referirse a 10 o menos aminoácidos.

5 El término "polinucleótido" comprende ADN, ADNc, ARN y ARNm.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" en el contexto de la presente memoria debe interpretarse como "incluido".

Las expresiones "célula", "estirpe celular", "cultivo celular" y "cepa" se utilizan indistintamente.

10 Extracto de células hospedadoras (extracto de ellas) como se emplea en la presente memoria se utiliza para referirse a parte o todo el contenido de la célula hospedadora, es decir

- el material obtenido de una lisis celular parcial o total al extraer algo o toda la materia química de las células, o
- el material obtenido de someter las células a tratamiento de tal manera que una o más de las proteínas expresadas procedentes de las células se liberan en la fase líquida.

15 La materia química y el material que forman el contenido de la célula hospedadora como se emplea en la presente memoria se refiere a los líquidos, proteínas, lípidos, azúcares, lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ADN, ARN plásmidos y cromosómicos, pequeñas moléculas tales como aminoácidos, iones metálicos, moléculas redox activas, los ARNt y fragmentos de todos los anteriores del interior de la célula.

20 Los métodos para liberar una o más proteínas de las células comprenden el tratamiento térmico y/o someter a las células a presión no lisante y/o utilización de productos químicos como por ejemplo: tampones, agentes quelantes, detergentes, alteración física y/o empleo de energía sónica y/o empleo de cizallamiento mecánico.

Muestra de células gram-negativas como se emplea en la presente memoria se refiere a un población de células gram-negativas, por ejemplo al menos dos células gram-negativas pero más específicamente a un lote empleado en un proceso de fermentación, en particular un proceso de fermentación comercial.

25 Anticuerpo recombinante purificado o uno de sus fragmentos de fijación como se emplea en la presente memoria tiene por objeto referirse a una forma del anticuerpo o fragmento en donde existen menos impurezas y contaminantes que en la correspondiente forma sin tratar. No se piensa necesariamente que sea un término absoluto porque el anticuerpo o fragmento puede necesitar todavía más etapas de purificación.

30 En una realización un anticuerpo recombinante purificado o uno de sus fragmentos de fijación proporcionados por el método según la presente invención está sustancialmente puro.

Sustancialmente puro tal como se emplea en la presente memoria se refiere a donde el anticuerpo o uno de sus fragmentos de fijación tiene más del 90% de pureza, por ejemplo 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de pureza, en particular 95% de pureza o más.

35 Esta invención descrita en la presente memoria está basada en la sorprendente e inesperada observación de que después de cultivar una muestra de células hospedadoras transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de proteína recombinante puede utilizarse una etapa de ajuste del pH a 5 o menos para precipitar disulfuro isomerasa recombinante y que ésta tiene un impacto beneficioso significativo sobre la purificación de la proteína.

40 Etapa a) de la presente invención requiere el ajuste de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma a un pH de 5 o inferior, un pH inferior a 5, un pH de 4,5 o inferior o un pH de 3 o inferior. En una realización preferida, el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH de 4,5 o menos, más preferiblemente un pH de aproximadamente 4,5. Los inventores han descubierto que un pH de 4,5 es especialmente conveniente para precipitar y permitir la separación de DsbC recombinante.

45 En una realización el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma no se ajusta a un pH que es inferior a pH 3 o alternativamente inferior a pH 3,5. Por consiguiente, el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta preferiblemente a un pH de 3 a 4,9, un pH de 3,5 a 4,9, un pH de 3 a 4,5 o un pH de 3,5 a 4,5.

50 En una realización el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH de 3 o menos, más preferiblemente un pH de aproximadamente 3. Los inventores han descubierto que un pH de 3 o menos es adecuado para precipitar y permitir la separación de DsbC recombinante y también de la proteína de fijación al dipéptido de la célula hospedadora.

Sin embargo, mientras que los pH de 3 o menos son adecuados para precipitar la proteína DsbC procedente de la célula hospedadora o de un extracto, los pH bajos pueden alterar la estructura plegada del anticuerpo o de uno de sus fragmentos de fijación y por lo tanto pueden no ser óptimos cuando se consideran todos los parámetros del procedimiento.

- 5 Por lo tanto el pH óptimo para precipitar las proteínas de la célula hospedadora dependerá del anticuerpo específico o del fragmento de anticuerpo expresado por la célula y en especial de la estabilidad del mismo en el intervalo relevante de pH.

Al menos una disulfuro isomerasa, por ejemplo al menos DsbC se precipita empleando el procedimiento. En una realización una u otras proteínas de célula hospedadora más se precipitan también empleando el procedimiento.

- 10 En la etapa a) del método de la presente invención la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma pueden mantenerse al pH inferior, por ejemplo a un pH de 5 o menos durante cualquier periodo adecuado antes de llevar a cabo cualesquiera de las etapas de purificación adicionales, tales como centrifugación y/o filtración, y/o anteriormente un ajuste de pH ulterior por lo general para aumentar el pH de la solución. Generalmente la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma se conservará durante 24 horas o menos, 12 horas o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 30 minutos o menos, 10 minutos o menos o 7 minutos o menos.

Después de emplear el método de la invención el pH puede aumentarse, por ejemplo a pH 6, 6,5 o 7 antes del tratamiento ulterior, es decir, de la subsecuencia tal como purificación ulterior, por ejemplo la purificación se lleva a cabo empleando cromatografía de intercambio aniónico .

- 20 La etapa a) del método de la presente invención puede realizarse a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo a temperatura ambiente, tal como 20-23°C o a temperatura reducida tal como 1-10°C. Por lo tanto los intervalos adecuados de temperatura para llevar a cabo el método comprenden al menos 1 a 30°C.

- El ajuste del pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma puede realizarse utilizando cualquier agente adecuado capaz de cambiar el pH. Ejemplos de agentes adecuados son el ácido acético glacial, hidróxido sódico, sódico acetato o la base tris y una de sus combinaciones. El agente puede estar a cualquier concentración adecuada tal como ácido acético glacial al 30 o 60% (v/v), hidróxido sódico 1 M, acetato sódico 1 M y base tris 2 M o 3 M.
- 25

- Uno o más de estos agentes son especialmente provechosos para su utilización en el método según la presente descripción y, por ejemplo permitiendo la precipitación y eliminación de la disulfuro isomerasa recombinante en la purificación de una proteína terapéutica porque son atóxicos.
- 30

- La disulfuro isomerasa es una enzima que cataliza la formación y rotura de enlaces disulfuro entre restos de cisteína dentro de las proteínas a medida que se pliegan. La proteína disulfuro isomerasa se libera de la célula hospedadora tras la extracción de la proteína recombinante. La célula hospedadora utilizada en el método de la presente invención produce disulfuro isomerasa recombinante y, Por consiguiente, la disulfuro isomerasa recombinante constituye una proporción significativa de proteína contaminante de célula hospedadora. La presente invención ha proporcionado un tiempo y métodos de ahorro de costes para eliminar la disulfuro isomerasa recombinante de la proteína recombinante. La disulfuro isomerasa recombinante, tal como DsbC, puede comprender una etiqueta de histidina (etiqueta his) en el terminal N y/o el terminal C.
- 35

- La etiqueta de histidina tiene ventajas porque permite el seguimiento eficaz para demostrar que la contaminación DsbC se ha eliminado del anticuerpo o de uno de sus fragmentos de fijación. Esto es importante porque la presencia de DsbC puede ser difícil de detectar cuando se utilizan sueros policlonales producidos contra los contenidos celulares procedentes de *E. coli* natural porque los sueros policlonales tienden a ser poco reactivos o nada reactivos para DsbC, y por eso son incapaces de detectar DsbC aún cuando estén sobreexpresados en grandes concentraciones. La presencia de una etiqueta de detección tal como poli-His garantiza que la eliminación de DsbC abundantemente sobreexpresada puede seguirse/confirmarse empleando métodos sensibles de inmunodetección.
- 40
- 45

- En una realización preferida, la disulfuro isomerasa recombinante es DsbC. DsbC es una proteína procarótica que se encuentra en el periplasma de *E. coli* que cataliza la formación de enlaces disulfuro en *E. coli*. DsbC tiene una longitud de secuencia de aminoácidos de 236 (incluido el péptido señal) y un peso molecular de 25,6 KDa (UniProt nº P0AEG6). DsbC se identificó en primer lugar en 1994 (Missiakas *et al.* The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation, The EMBO Journal vol. 13, nº 8, págs. 2013-2020, 1994 y Shevchik *et al.* Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* y *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity, The EMBO Journal vol. 13, nº 8, págs. 2007-2012, 1994). La proteína DsbC puede comprender una etiqueta de histidina (etiqueta his) en el terminal N y/o el terminal C.
- 50

- El pI previsto de DsbC es 5,7 y el pI previsto de DsbC marcada con his es 6,3. El pI de una proteína puede preverse utilizando una variedad de programas informáticos disponibles en el mercado y gratis para el público y equipos de predicción de pI en línea tal como ExpASY ProtParam.
- 55

Cabe esperar que las proteínas precipiten si el pH de la solución supera el pI de la proteína. Sin embargo, en la figura 4 puede observarse que una solución de DsbC (marcada con his) exenta de células hospedadoras o de extracto de células hospedadoras cuando el pH se ajusta a 3 no precipita porque la cantidad de DsbC no se reduce tras el ajuste de pH. Sorprendentemente, se ha descubierto que DsbC precipita cuando una muestra de células

- 5 hospedadoras o un extracto de la misma que comprende DsbC recombinante se somete a un ajuste de pH inferior a pH 5 una cantidad significativa de la DsbC precipita y puede separarse de una proteína recombinante de interés, como se muestra en la figura 3. Por consiguiente, no es posible predecir a partir del pI predicho de una proteína, tal como DsbC, qué pH se necesita para permitir la precipitación de una muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma.
- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o produce empleando tecnología de ADN recombinante. La secuencia de polinucleótidos que codifica la disulfuro isomerasa puede ser idéntica a una secuencia endógena que codifica disulfuro isomerasa hallada en células bacterianas. Alternativamente, la secuencia de polinucleótidos recombinante que codifica la disulfuro isomerasa es una versión mutada de la secuencia de disulfuro isomerasa natural, por ejemplo con una secuencia de
- 15 restricción eliminada. En la realización en donde la disulfuro isomerasa es DsbC, la secuencia de restricción EcoRI puede eliminarse y/o agregarse una secuencia que codifica una etiqueta his. Un ejemplo de secuencia nucleotídica de DsbC modificada para su utilización en la presente invención se muestra en la SEQ. ID. n°: 11, que codifica la secuencia de aminoácidos de DsbC marcada con his mostrada en la SEQ. ID. n°: 12.

- 20 En una realización la DsbC mutante consiste en una proteína DsbC con una zona activa mutada representada por - CXXC- en donde XX es TF, GF, HH, NY, SF, MF, VH, SH, RF, FA, GA, MA, GI, AV, PS, QA, SV, PR, PP, AL, PL, FL, TR, LL, VL, QL, LQ.

- 25 Antes de la etapa a) del método de la presente invención, el método puede comprender cultivar una muestra de células hospedadoras transformada con uno o más vectores de expresión que codifican una proteína recombinante y una disulfuro isomerasa recombinante. La muestra puede estar a cualquier escala adecuada desde la producción a pequeña escala de proteínas hasta la fabricación a gran escala de proteínas con fines comerciales.

En una realización, en donde la proteína es un anticuerpo, los anticuerpos recombinantes producidos a partir de la célula hospedadora pueden ser una mezcla de anticuerpos funcionales y no funcionales.

- 30 La célula hospedadora comprende un polinucleótido recombinante que codifica una disulfuro isomerasa que puede estar presente en un vector de expresión adecuado transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula hospedadora. Preferiblemente el polinucleótido que codifica la disulfuro isomerasa está en un vector de expresión en la célula causando por consiguiente mínima alteración en el genoma de la célula hospedadora. La proteína recombinante y la disulfuro isomerasa recombinante pueden estar presentes en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión independientes.

- 35 Las células utilizadas en la presente invención son bacterias gram-negativas. Aún más preferiblemente, las células son *E. coli*. Las células son células recombinantes que se han modificado genéticamente. Las células hospedadoras de *E. coli* son cepas mutadas capaces de producir proteínas recombinantes. Las células hospedadoras de *E. coli recombinante* pueden proceder de cualesquiera de las cepas adecuadas de *E. coli* y comprenden MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue y JM109. Un ejemplo es W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) cepa hospedadora utilizada generalmente para fermentaciones de proteínas recombinantes. Los ejemplos incluyen
- 40 también cepas modificadas de *E. coli*, por ejemplo mutantes metabólicos y cepas carentes de proteasa.

La célula hospedadora está genéticamente modificada para producir disulfuro isomerasa recombinante. Las células hospedadoras que producen disulfuro isomerasa recombinante son especialmente beneficiosas porque la presencia de la disulfuro isomerasa recombinante puede reducir la lisis celular y puede ayudar en el tratamiento de la proteína recombinante.

- 45 En una realización preferida la célula hospedadora comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica DsbC recombinante, incluida DsbC marcada con his.

La célula hospedadora según la presente invención puede comprender una o más modificaciones genéticas adicionales.

- 50 En una realización, la célula hospedadora puede tener actividad reducida de proteasa, en donde la célula comprende un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene actividad reducida de proteasa o es un gen Tsp mutado transgénico.

- 55 Por ejemplo, la célula hospedadora puede tener actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula natural. Tsp (conocida también como Prc) es una proteasa periplásmica de 60kDa. El primer sustrato conocido de Tsp fue la proteína-3 de fijación a la penicilina (PBP3) (Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*; Nagasawa H., Sakagami Y., Suzuki A., Suzuki H., Hara H., Hirota Y. *J. Bacteriol.* Nov. de 1989; 171(11):5890-3 y Cloning, mapping and characterization of the *Escherichia coli* Tsp gene which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3; Hara H,

Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y. J Bacteriol. 1991 Aug;173 (15):4799-813) but it was later discovered that the Tsp was also able to cleave phage tail proteins and, therefore, it was renamed as Tail Specific Protease (Tsp) (Silber *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 295-299 (1992)).

5 En esta realización la célula hospedadora tiene actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula natural. La expresión actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula natural" significa que la actividad de Tsp de la célula está reducida en comparación con la actividad de Tsp de una célula natural. La célula puede estar modificada por cualquier medio adecuado para reducir la actividad de Tsp. En una realización la actividad reducida de Tsp procede de la modificación del polinucleótido endógeno que codifica Tsp y/o secuencias de expresión reguladoras asociadas. La modificación puede reducir o detener la transcripción y traducción del gen Tsp o puede proporcionar la proteína Tsp expresada con actividad reducida de proteasa en comparación con la proteína Tsp natural. En una realización se modifica la secuencia de expresión reguladora asociada para reducir la expresión de Tsp. Por ejemplo, el activador para el gen Tsp puede mutarse para evitar la expresión del gen. En una realización preferida la célula según la presente invención lleva un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp con actividad reducida de proteasa o un gen Tsp mutado transgénico. Preferiblemente el gen Tsp cromosómico está mutado.

10 La reducción de la actividad de Tsp (prc) es deseable para reducir la proteólisis de proteínas de interés. Sin embargo, se descubrió que las células que carecen de proteasa prc presentan crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Hara *et al.* aislaron inversores termoresistentes que contienen mutaciones de supresor (spr) extragénico (Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). Spr es una proteasa periplásmica unida a la membrana de 18 kDa y los sustratos de spr son Tsp y peptidoglucanos en la membrana externa involucrados en la hidrólisis de la pared celular durante la división celular. El gen spr se designa como UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (SPR_ECOLI). Se han descrito cepas carentes en proteasa mejoradas que comprenden el gen spr mutante. Chen *et al.* (Chen C., Snedecor B., Nishihara J.C., Joly J.C., McFarland N., Andersen D.C., Battersby J.E., Champion K.M. *Biotechnol. Bioeng.* 5 de marzo de 2004; 85(5):463-74) describe el montaje de cepas de *E. coli* que llevan diferentes combinaciones de mutaciones en prc (Tsp) y otra proteasa, DegP, creada por ampliación de las zonas aguas arriba y aguas abajo del gen y ligando éstas en un vector que comprende marcadores de selección y una mutación de sprW174R (Alto nivel de acumulación de un fragmento de anticuerpo recombinante en el periplasma de *Escherichia coli* requiere una cepa hospedadora mutante triple (Δ DegP Δ prc sprW174R) .

15 La secuencia de aminoácidos naturales de la proteína spr se muestra en SEQ. ID. n°: 13 con la secuencia señal en el terminal N y en SEQ. ID. n°: 14 sin la secuencia señal de 26 aminoácidos (según el número de registro P0AFV4 de UniProt). El total de aminoácidos de la secuencia de la proteína spr en la presente invención incluye la secuencia señal. Por consiguiente, el aminoácido 1 de la proteína spr es el primer aminoácido (Met) mostrado en la SEQ. ID. n°: 13.

20 En otra realización la célula comprende un gen spr mutado. El gen spr mutante que codifica una proteína spr puede tener una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados de entre C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147, H157 y W174. Preferiblemente el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados de entre C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 y H157. Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados de entre S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. Las mutaciones de spr pueden suprimir el fenotipo de crecimiento de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

25 Uno o más de los aminoácidos C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147, H157 y W174 puede ser mutado a cualquier aminoácido adecuado lo que da como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno o más de entre S95, V98, Y115, D133 y V135 puede ser mutado a un pequeño aminoácido tal como Gly o Ala. En una realización preferida la proteína spr comprende una o más de las siguientes mutaciones: C94A, S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D o G, H145A, G147C y H157A.

30 En otra realización el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene la mutación W174R. En una realización alternativa la proteína spr no tiene la mutación W 174R.

35 La designación para un mutante de sustitución en la presente memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína natural. El número hace referencia a la posición del aminoácido donde se está haciendo la sustitución del aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se utiliza para sustituir el aminoácido natural.

40 Así pues, en una realización preferida la célula utilizada en la presente invención comprende un polinucleótido recombinante que codifica a DsbC y un gen spr mutado, como se ha definido anteriormente.

45 En otra realización preferida la célula utilizada en la presente invención tiene actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula natural y comprende un polinucleótido recombinante que codifica a DsbC y un gen spr mutado, como se ha definido anteriormente.

50 En una realización la célula hospedadora comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP con actividad de chaperona y actividad reducida de proteasa y/o un gen ptr mutado, en donde el gen ptr mutado codifica

una proteína Proteasa III con actividad reducida de proteasa o es un gen ptr transgénico mutado y/o un gen OmpT mutado, en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT con actividad reducida de proteasa o es un gen OmpT transgénico mutado.

En una realización la célula hospedadora expresa una o más proteínas de la manera siguiente:

- 5 • una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID; y/o
- una o más proteínas capaces de facilitar la segregación o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; y/o
- 10 • una o más proteínas capaces de facilitar la formación del enlace disulfuro, tales como DsbA, DsbB, DsbD, DsbG.

Una o más de las proteínas anteriores puede(n) estar integrada(s) en el genoma de la célula y/o insertada(s) en un vector de expresión.

En una realización la célula hospedadora no comprende polinucleótidos recombinantes que codifican una o más de las proteínas siguientes:

- 15 • una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID;
- una o más proteínas capaces de facilitar la segregación o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; y
- 20 • una o más proteínas capaces de facilitar la formación del enlace disulfuro, tales como DsbA, DsbB, DsbD, DsbG.

En una realización la célula utilizada en la presente invención tiene actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula natural y comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y un gen spr mutado, como se ha definido anteriormente comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y un gen spr mutado, como se ha definido anteriormente, y FkpA y/o Skp.

- 25 La proteína recombinante producida utilizando los métodos de la presente invención se expresa por lo general en el periplasma de la célula hospedadora de *E. coli* o en el sobrenadante del cultivo de células hospedadoras, dependiendo de la naturaleza de la proteína y de la escala de producción. Los métodos para dirigir las proteínas a estos compartimentos son bien conocidos en la técnica, para un estudio véase Makrides, *Microbiological Reviews*, 1996, 60, 512-538. Ejemplos de secuencias señal adecuadas para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen
- 30 las secuencias señal PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*. Las proteínas pueden dirigirse al sobrenadante dependiendo de las rutas secretoras naturales o mediante la inducción de la fuga limitada de la membrana externa para producir ejemplos de secreción de proteínas entre los que están la utilización del *peIB* principal, la proteína A principal, la coexpresión de la proteína de liberación de bacteriocina la proteína de liberación de bacteriocina inducida por mitomicina junto con la adición de glicina al medio de cultivo y la coexpresión del gen *kil* para la
- 35 permeabilización de la membrana. Aún más preferiblemente, en los métodos de la invención, la proteína recombinante se expresa en el periplasma del hospedador *E. coli*.

- La expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras *E. coli* puede estar también bajo el control de un sistema inducible, mediante el cual la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* está bajo el control de un activador inducible. En la técnica son muy conocidos muchos activadores inducibles adecuados para su utilización
- 40 en *E. coli* y dependiendo del activador, la expresión de la proteína recombinante puede ser inducida por varios factores tal como la temperatura o la concentración de una sustancia específica en el medio de cultivo (Baneyx, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10:411-421; Goldstein y Doi, 1995, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 105-128). Ejemplos de activadores inducibles comprenden los activadores *lac*, *tac* y *trc* de *E. coli* que son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los activadores *phoA*,
- 45 *trp* y *araBAD* que son inducidos por fosfato, triptófano y L-arabinosa respectivamente. La expresión puede inducirse, por ejemplo, por la adición de un inductor o por un cambio en la temperatura en la que la inducción depende de la temperatura. Cuando la inducción de la expresión de la proteína recombinante se consigue mediante la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede añadirse por cualquier método apropiado dependiendo del sistema de fermentación y del inductor, por ejemplo, por una o múltiples adiciones por inyección o mediante una adición gradual
- 50 de inductor con un alimento. Se valorará que pueda haber un retraso entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión proteica, por ejemplo, cuando el inductor es la lactosa puede haber un retraso antes que ocurra la inducción de la expresión proteica mientras que se utilice cualquier fuente de carbono preexistente antes de la lactosa.

Los cultivos (fermentaciones) de células hospedadoras de *E. coli* pueden cultivarse en cualquier medio que soporte el cultivo de *E. coli* y la expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente definido, tales como los proporcionados en Pirt S. J. (1975) *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Publications, con modificaciones cuando proceda para controlar la velocidad de crecimiento como se describe en la presente memoria. Un ejemplo de un medio adecuado es 'SM6E' según describe Humphreys *et al.*, 2002, *Protein Expression and Purification*, 26:309-320.

El cultivo de las células hospedadoras de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado tal como un matraz con agitador o un fermentador dependiendo de la escala de producción requerida. Están disponibles varios fermentadores a gran escala con una capacidad de más de 1.000 litros hasta aproximadamente 100.000 litros. Preferiblemente, se utilizan fermentadores de 1.000 a 50.000 litros, más preferiblemente de 1.000 a 10.000 o 12.000 litros. Pueden utilizarse también fermentadores a escala más pequeña con una capacidad de entre 0,5 y 1.000 litros.

La fermentación de *E. coli* puede realizarse en cualquier sistema adecuado, por ejemplo en modo continuo, por lotes o semicontinuo (Thiry y Cingolani, 2002, *Trends in Biotechnology*, 20:103-105) dependiendo de la proteína y los rendimientos requeridos. El modo por lotes puede utilizarse con adiciones por inyección de nutrientes o inductores cuando se requiera. Alternativamente, puede utilizarse un cultivo semicontinuo y las cultivos desarrollados en modo preinducción por lotes a la velocidad máxima de crecimiento específico que puede mantenerse utilizando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentos nutrientes utilizados para controlar el ritmo de crecimiento hasta que termina la fermentación. Puede utilizarse también pre-inducción en modo semicontinuo para controlar el metabolismo de las células hospedadoras de *E. coli* y para permitir que se alcancen mayores densidades celulares (Lee, 1996, *Tibtech*, 14:98-105).

Si se desea, las células hospedadoras pueden someterse a recolección en el medio de fermentación, p. ej. pueden recogerse células hospedadoras de la muestra por centrifugación, filtración o por concentración. En particular, los métodos de la invención son adecuados para la preparación a gran escala industrial de anticuerpos de calidad terapéutica.

En una realización el método según la presente invención comprende una etapa de centrifugación tras la etapa de cultivo, seguida de suspensión de las células por adición del tampón de extracción.

Después de la etapa de cultivo, el método puede comprender una etapa de extracción para liberar la proteína recombinante de la célula hospedadora. La extracción puede realizarse por cualquier método adecuado tal como lisis celular mediante tratamiento mecánico o a presión, tratamiento de congelación-descongelación, choque osmótico, agentes de extracción o tratamiento térmico. Dichos métodos de extracción son muy conocidos en la técnica.

En una realización el tampón de extracción se añade a la muestra y la muestra se somete a continuación a una etapa de tratamiento térmico. La etapa de tratamiento térmico es preferiblemente como se describe con detalle en el documento US 5.665.866. La etapa de tratamiento térmico permite obtener una muestra de anticuerpo soluble, correctamente plegado y ensamblado facilitando la eliminación de otro material relacionado con el anticuerpo. Anticuerpo que está "correctamente plegado y ensamblado" se muestra por la presencia de una sola banda correspondiente al peso molecular esperado para las cadenas pesada y ligera ensambladas en SDS PAGE no reductora. Otro material relacionado con el anticuerpo estará por lo general exento de las cadenas pesada y ligera o parte de las mismas, de fragmentos parcialmente degradados de anticuerpo correctamente plegado y ensamblado.

La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo sometiendo la muestra a una temperatura elevada deseada. Aún más preferiblemente, la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo dentro del intervalo de 30°C a 70°C. La temperatura puede seleccionarse como se desea y puede depender de la estabilidad de la proteína para purificación. En otra realización, la temperatura está dentro del intervalo de 40°C a 65°C, o preferiblemente dentro del intervalo de 40°C a 60°C, más preferiblemente dentro del intervalo de 45°C a 60°C, aún más preferiblemente dentro del intervalo de 50°C a 60°C y aún más preferiblemente de 55°C a 60°C, 58°C a 60°C o 59°C. Por lo tanto, las temperaturas mínimas son 30°C, 35°C o 40°C y las temperaturas máximas 60°C, 65°C o 70°C.

La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo prolongado. La duración del tratamiento térmico es preferiblemente de entre 1 y 24 horas, más preferiblemente de entre 4 y 18 horas, aún más preferiblemente de entre 6 y 16 horas y aún más preferiblemente de entre 10 y 14 horas, por ejemplo 12 horas. Así, el tiempo mínimo para el tratamiento térmico es de 1, 2 o 3 horas y el máximo es de 20, 22 o 24 horas.

En una realización específica, el tratamiento térmico se realiza de 50°C a 60°C durante 10 a 16 horas, y más preferiblemente a 59°C durante 10 a 12 horas. Un experto en la técnica entenderá que las temperaturas y el tiempo pueden seleccionarse como conviene a la muestra en cuestión y a las características de la proteína que se está produciendo.

Después de la etapa de extracción la muestra puede someterse a una etapa de centrifugación y/o filtración antes de la etapa de ajuste del pH.

La muestra que se somete a la etapa a) de la presente invención es una muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma. Por consiguiente, la etapa a) puede, por ejemplo llevarse a cabo en:

- una solución que comprende la población de células hospedadoras que expresan la proteína recombinante y disulfuro isomerasa recombinante;
- 5 • el sobrenadante de la población de células hospedadoras que expresan la proteína recombinante y disulfuro isomerasa recombinante después de la centrifugación y/o filtración para eliminar las células hospedadoras;
- el extracto de la población de células hospedadoras que expresan la proteína recombinante y disulfuro isomerasa recombinante después de una etapa de extracción, tal como el tratamiento térmico; o
- 10 • el extracto de la población de células hospedadoras que expresan la proteína recombinante y disulfuro isomerasa recombinante después de una etapa de extracción, tal como el tratamiento térmico, y una o más etapas posteriores de centrifugación y/o filtración.

Antes de la etapa a), la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma está a un pH adecuado, por lo general el pH de la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma es pH 5 a 10, preferiblemente pH 6 a 8 o aproximadamente pH 7. El pH de la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma antes de la etapa a) puede depender del pI de la proteína recombinante de interés. Las proteínas pueden tener una tendencia a precipitar si el pH está ajustado a o en todo el pI de la proteína. Por consiguiente, es preferible que el pH de la solución antes de la etapa de ajuste de pH sea menor que el pI de la proteína recombinante para garantizar que la etapa de ajuste de pH no lleva el pH de la solución a o en todo el pI de la proteína recombinante. Por ejemplo, si el pI de la proteína recombinante es alrededor de 8, el pH de la solución es preferiblemente inferior a pH 8 con objeto de minimizar la precipitación de la proteína recombinante. La etapa de reducción del pH a menos de pH 5 evitará además preferiblemente el pI de la proteína recombinante.

El pI de una proteína dependerá de la fuerza iónica de la solución en que está. Así pues, el pI calculado de una proteína en agua o tampón de fuerza iónica muy baja puede ser diferente al pI de una proteína en una muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma que comprende tampón y PCH. El pI de una proteína puede ser 1, 1,5 o 2 unidades de pH inferior al pI medido de la proteína en agua o tampón de fuerza iónica muy baja. Por consiguiente, el pH de la solución de células hospedadoras o un extracto de la misma se mantiene preferiblemente a un pH de 1, 1,5 o 2 unidades de pH inferior al pI de la proteína recombinante de interés medido en agua o tampón de fuerza iónica muy baja.

En la etapa b) del método según la presente invención, la disulfuro isomerasa recombinante precipitada se separa de la proteína recombinante para producir una muestra de proteína recombinante. La etapa b) por lo general comprende centrifugación y/o filtración con objeto de separar la disulfuro isomerasa recombinante precipitada.

La muestra de proteína recombinante resultante tiene una cantidad reducida de disulfuro isomerasa recombinante en comparación con la cantidad de disulfuro isomerasa recombinante antes de la etapa a). Preferiblemente la muestra de proteína recombinante después de la etapa b) está sustancialmente exenta de disulfuro isomerasa recombinante. Sin embargo, es posible que algo de disulfuro isomerasa recombinante quede en la muestra, que puede eliminarse mediante etapas de purificación posterior. El experto en la técnica puede determinar si la disulfuro isomerasa recombinante está todavía presente en la muestra de proteína recombinante empleando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un análisis ELISA para detectar la disulfuro isomerasa recombinante, tal como DsbC. Un anticuerpo específico para la disulfuro isomerasa recombinante, tal como DsbC, puede utilizarse o si la disulfuro isomerasa recombinante está etiquetada con his, tal como la etiqueta DsbC-his, puede utilizarse un anticuerpo con etiqueta anti-His para la detección de la disulfuro isomerasa recombinante.

Sustancialmente exento de, como se emplea en la presente memoria tiene por objeto referirse a que contiene 5% p/p o menos, tal como 4, 3, 2, 1 o 0,5% p/p o menos.

En una realización, donde el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma está ajustado a un pH de 3 o menos (tal como pH 3), la proteína de fijación al dipéptido de la proteína de la célula hospedadora (también denominada "DBP") se precipita y se separa de la proteína recombinante en la etapa b). En esta realización la muestra de proteína recombinante resultante también ha reducido cantidad de proteína de fijación al dipéptido (DBP) de la célula hospedadora. Preferiblemente la muestra de proteína recombinante resultante está sustancialmente exenta de DBP.

Preferiblemente la muestra de proteína recombinante resultante también ha reducido cantidad de otras proteínas de la célula hospedadora que pueden precipitar también durante la etapa a). Preferiblemente la muestra de proteína recombinante resultante está sustancialmente exenta de otras proteínas de células hospedadoras.

El rendimiento de la proteína recombinante de interés después de las etapas a) y b) de la presente invención es por lo general del 75% o más, 80% o más, 85% o más o 90% o más.

Después de la etapa b), el pH de la muestra de proteína recombinante puede ajustarse a un pH adecuado para almacenar la proteína recombinante o para llevar a cabo una etapa de purificación aguas abajo, tal como cromatografía. Como se expuso anteriormente, el pH de la solución puede ajustarse para minimizar la precipitación de la proteína recombinante de interés garantizando que el pH no está en el pI de la proteína recombinante.

- 5 Preferiblemente el pH de la muestra de proteína recombinante se ajusta a un pH de 5 a 7, más preferiblemente a un pH de 5 a 6. El pH exacto requerido dependerá de las propiedades de la proteína recombinante, como por ejemplo el pI de la proteína, y qué etapas de purificación aguas abajo se han de llevar a cabo. Cualquier agente adecuado puede utilizarse para ajustar el pH de la muestra de proteína recombinante, tal como una base seleccionada de entre NaOH, acetato Na o base Tris.
- 10 Alternativamente, el método no comprende una etapa de ajuste de pH tras la etapa b). En esta realización, el pH de la muestra de proteína recombinante puede ser adecuado para almacenamiento de la proteína recombinante y/o para una o más etapas de purificación aguas abajo posteriores. En una realización, en la etapa a) el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma está ajustado a un pH de 4,5, la etapa b) comprende centrifugación y filtración y la solución de proteína recombinante resultante tras la etapa b) se somete a continuación
- 15 a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico a pH 4,5.

Alternativamente puede realizarse una etapa de cromatografía a pH mayor, por ejemplo pH o por encima de, tal como 5 a 8, en particular 6 o 7.

- Después de la etapa b), la muestra de proteína recombinante puede someterse a una o más etapas de purificación adicionales con objeto de eliminar contaminantes y/o fragmentos de proteínas indeseables tales como fragmentos
- 20 de anticuerpos. Por lo general la muestra de proteína recombinante se somete a una o más etapas de cromatografía, en donde cada etapa de cromatografía puede ser seguida de una etapa de filtración, tal como microfiltración, diafiltración o ultrafiltración. Una o más etapas de cromatografía pueden ser etapas de cromatografía de afinidad o no de afinidad. En una realización el cromatógrafo es una etapa de cromatografía no de afinidad tal como cromatografía de intercambio iónico catiónico o aniónico.

- 25 En una realización, en la etapa a) el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma está ajustado a un pH de 4,5, la etapa b) comprende centrifugación y filtración y la solución de proteína recombinante resultante tras la etapa b) se somete a continuación a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico a pH 4,5.

- El método de la presente invención es especialmente provechoso cuando se utilizan las etapas de cromatografía no de afinidad en la purificación aguas abajo. Esto es porque una gran cantidad de proteínas de célula hospedadora,
- 30 incluida la disulfuro isomerasa recombinante, puede unirse a las columnas de cromatografía si no se han separado previamente. Por consiguiente, la capacidad de la columna cromatográfica para unir la proteína recombinante deseada se reduce. La separación de proteínas de célula hospedadora, incluida la disulfuro isomerasa recombinante aumenta la capacidad de columnas de cromatografía no de afinidad posterior que proporciona un método más rápido y más económico para la purificación de la proteína recombinante.

- 35 Durante la etapa a) de la presente invención, la proteína recombinante puede desplegarse parcialmente aunque la solución se mantenga al pH de 5 o menos. Sin embargo, el desplegamiento parcial de la proteína es reversible y después de la separación de la disulfuro isomerasa precipitada, el pH de la solución de proteína puede ajustarse a un pH por encima de 5, preferiblemente un pH de 5 a 7, o un pH de 5 a 6, y la proteína puede entonces adoptar su estructura plegada original. Por lo tanto sobre todo la etapa de retención de bajo pH proporciona condiciones
- 40 relativamente suaves para eliminar las impurezas, con mínimas consecuencias a largo plazo. La muestra de proteína recombinante proporcionada por el método de la presente invención comprende una proporción significativa de proteína funcional.

- La proteína recombinante de interés expresada por las células hospedadoras, preferiblemente tiene un pI de 6 o mayor, más preferiblemente un pI de 7 o mayor. Como se expuso anteriormente, si la proteína tiene un pI de 6 o
- 45 mayor es más fácil minimizar la precipitación de la proteína manteniendo el pH de la muestra por debajo del pI de la proteína, preferiblemente 1, 1,5 o 2 unidades de pH por debajo del pI de la proteína en agua o tampón de fuerza iónica muy baja, y la etapa de ajuste del pH de la muestra a pH 5 o menos no ajusta el pH de la solución al pI de la proteína.

- La proteína recombinante de interés es preferiblemente un anticuerpo recombinante. El anticuerpo recombinante
- 50 preferiblemente tiene un pI de 6 a 10, 7 a 10, 6 a 9, 7 a 9, 8 a 9, 6, 7, 8 o 9. El pH de la muestra se mantiene preferiblemente por debajo del pI del anticuerpo recombinante, más preferiblemente 1, 1,5 o 2 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo recombinante, antes, durante y después de la etapa a) con objeto de garantizar la precipitación mínima del anticuerpo.

- En una realización preferida, el anticuerpo recombinante tiene un pI de 7-9 y el pH de la muestra se ajusta a pH 3 a
- 55 4,5, más preferiblemente pH 4,5, en la etapa a).

Un ejemplo específico de un anticuerpo recombinante es anti-FNT Fab' CDP870, como se describe en la presente memoria y en el documento WO01/094585, que tiene un pI de 8.

En una realización el anticuerpo recombinante o uno de sus fragmentos de fijación es anti-FNT Fab' CDP870.

Tal como se emplea en la presente memoria, 'anticuerpo funcional' comprende moléculas de anticuerpo que conservan la capacidad para reconocer específicamente o unirse al antígeno contra el que se produjeron (antígeno afín) es decir el antígeno para el que es específico. La producción de un anticuerpo funcional se demuestra por la presencia de una sola banda en SDS-PAGE no reductora correspondiente al peso molecular esperado del anticuerpo, o por ensayo de enlace directo utilizando BIAcore u otros métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo pero sin limitarse a, ELISA. Los anticuerpos no funcionales comprenden fragmentos que no reconocen su antígeno afín, e incluyen anticuerpos incorrectamente plegados o incorrectamente ensamblados, cadenas pesadas y ligeras libres, y fragmentos de los mismos, incluyendo fragmentos parcialmente degradados de anticuerpos que no reconocen ni se unen a su antígeno afín.

Un fragmento de fijación de un anticuerpo es un fragmento que puede unirse al antígeno para el que el anticuerpo es específico.

En un ejemplo preferido, la molécula de anticuerpo recombinante es parte al menos de una cadena ligera de anticuerpos y es parte al menos de una cadena pesada de anticuerpos, de modo que al menos alguna de las moléculas de anticuerpo de la cadena ligera y pesada expresadas son capaces de combinarse para formar un anticuerpo funcional.

Tal como se emplea en la presente memoria, 'anticuerpos' comprenden anticuerpos que tienen cadenas pesadas y ligeras completas; fragmentos funcionalmente activos, fragmentos de fijación, derivados o análogos de los mismos y pueden ser, pero no se limitan a VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv bisagra alterado; un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada; un anticuerpo monocatenario, p. ej. un Fv monocatenario en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos por un enlazador peptídico, Fab-Fv, o un anticuerpo con doble especificidad, tal como un Fab-dAb, como se describe en el documento PCT/GB2008/003331.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales, bi-, tri- o tetra-valentes, anticuerpos humanizados o híbridos. Estos anticuerpos y sus fragmentos pueden ser naturales, humanizados, híbridos o anticuerpos injertados a RDC y pueden utilizarse técnicas convencionales de biología molecular para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de una especie no humana que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (RDC) procedentes de una especie no humana, y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089). Las moléculas de anticuerpo purificadas que utilizan los métodos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los métodos para crear estas moléculas de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341:544; Orlandi *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 322:323; Bird *et al.*, 1988, *Science*, 242:423; Queen y col., documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10:1-142; Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216:165-181).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocito B humano (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica del hibridoma-EBV (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos híbridos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que se han modificado genéticamente de forma que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Es probable que estos anticuerpos híbridos sean menos antigénicos. Pueden prepararse anticuerpos bivalentes mediante métodos conocidos en la técnica (Milstein *et al.*, 1983, *Nature*, 305:537-539; documento WO 93/08829; Trauneker *et al.*, 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659). Los anticuerpos bi-, tri- y tetra-valentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, el documento WO 92/22853).

Pueden generarse también secuencias de anticuerpos utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales basados en la clonación molecular y en la expresión de los ADNc de la región variable de inmunoglobulinas generados a partir de linfocitos individuales que se seleccionaron para la producción de anticuerpos específicos, tales como los descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(15):7843-7848, y en el documento WO 92/02551. Estos últimos métodos se basan en el aislamiento de células productoras de anticuerpos individuales que a continuación se expanden de manera clonal seguido de la detección sistemática de estos clones que están produciendo un anticuerpo que reconoce su antígeno afín, y, si se desea, la posterior identificación de la secuencia de sus genes variables en la cadena pesada (V_H) y ligera (V_L). Alternativamente, las células productoras de anticuerpos que reconocen su antígeno afín pueden cultivarse conjuntamente seguido de la detección sistemática.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a una célula, por ejemplo una proteína de la superficie celular sobre células, tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquiera proteína médicamente relevante, tales como las proteínas reguladas por incremento durante una enfermedad o una infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos específicos de proteínas de la superficie celular comprenden moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas β 1 p. ej. VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o CSF1-Receptor, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectina tipo 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (ACE), globulina de la grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC clase I y MHC clase II, KDR y VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, receptor A de IL-7 y cuando proceda, los receptores de los mismos.

Los antígenos solubles comprenden interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos víricos por ejemplo el virus respiratorio sincitial o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral FNT (anteriormente conocido como factor α de necrosis tumoral y denominado en la presente memoria FNT o FNT α), factor β de necrosis tumoral, factores estimuladores de colonias tal como G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β , WISP-1 y cuando proceda receptores de los mismos. Otros antígenos comprenden antígenos de la superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como el de la gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionúclidos y metales pesados, y venenos de serpientes y arañas y toxinas.

En una realización, el anticuerpo puede utilizarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

En una realización preferida el anticuerpo es un anticuerpo anti-FNT, más preferiblemente anti-FNT Fab' CDP870, como se describe en el documento WO01/094585.

En una realización el anticuerpo con especificidad para FNT α humano, comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 1 para RDCH1, la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 2 para RDCH2 o la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 3 para RDCH3.

En una realización el anticuerpo comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 4 para RDCL1, la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 5 para RDCL2 o la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 6 para RDCL3.

En una realización el anticuerpo comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 1 para RDCH1, la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 2 para RDCH2 o la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 3 para RDCH3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 4 para RDCL1, la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 5 para RDCL2 o la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°:6 para RDCL3.

En una realización el anticuerpo comprende la SEQ. ID. n°: 1 para RDCH1, la SEQ. ID. n°: 2 para RDCH2, la SEQ. ID. n°: 3 para RDCH3, la SEQ. ID. n°: 4 para RDCL1, la SEQ. ID. n°: 5 para RDCL2 y la SEQ. ID. n°: 6 para RDCL3.

El anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo injertada con RDC y normalmente el dominio variable comprende regiones marco receptoras humanas y RDC donantes no humanas.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera CDP870 (SEQ. ID. n°:7) y el dominio variable de cadena pesada CDP870 (SEQ. ID. n°: 8).

Es preferible que el anticuerpo sea un fragmento Fab modificado, en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de uno o más aminoácidos de su cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora o indicadora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos restos de cisteína a los cuales puede fijarse la molécula efectora o indicadora. Dicho fragmento Fab modificado tiene preferiblemente una cadena pesada que comprende o que consiste en la secuencia dada como SEQ ID n°: 10y la cadena ligera que comprende o que consiste en la secuencia dada como SEQ ID NO: 9.

La célula hospedadora utilizada en la presente invención comprende la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada y la ligera del anticuerpo.

En una realización preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena ligera y comprende la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 7 o la SEQ. ID. n°: 9 (CDP870) cadena pesada .

En una realización alternativamente preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena pesada y comprende la secuencia mostrada en la SEQ. ID. n°: 8 o SEQ. ID. n°: 10 (CDP870) o uno de sus equivalentes degenerados.

La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por tratamiento químico, ADNc, ADN genómico o una cualquiera de sus combinaciones.

- 5 Los dominios de la región constante del anticuerpo, si están presentes, se pueden seleccionar considerando la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden utilizar los dominios de las regiones constantes de IgG humanas, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, se pueden utilizar los isotipos IgG2 y IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se destina a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, p. ej. simplemente para bloquear la actividad del FNT α .
- 10

Los métodos para la expresión de proteínas recombinantes son muy conocidos en la técnica. Ejemplos apropiados de células hospedadoras para la expresión de moléculas de anticuerpos recombinantes incluyen bacterias tales como las bacterias gram positivas o gram negativas, p. ej. *E. coli*, o células de levadura, p. ej. *S. cerevisiae*, o células de mamífero, p. ej. células de CHO y estirpes celulares de mieloma o hibridoma, p. ej. células de NSO. Más preferiblemente, en los métodos de la invención, se produce un anticuerpo recombinante en las bacterias, p. ej. en *E. coli* (véase Venna *et al.*, 1988, *J. Immunol. Methods* 216:165-181; Simmons *et al.*, 2002, *J. Immunol. Methods* 263:133-147).

- 15
- 20 Tras la expresión, el anticuerpo puede procesarse más, por ejemplo mediante conjugación a otra entidad tal como una molécula efectora. Por consiguiente, el método según la presente invención puede comprender una etapa adicional de unión de una molécula efectora al anticuerpo.

La expresión 'molécula efectora', tal y como se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas, p. ej., ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por espectroscopia RMN o RES. El efector molecular puede estar unido al anticuerpo o a uno de sus fragmentos por cualquier método adecuado, por ejemplo el fragmento de anticuerpo puede modificarse para unir al menos una molécula efectora como se describe en los documentos WO05/003171 o WO05/003170. Los documentos WO05/003171 o WO05/003170 describen además moléculas efectoras adecuadas.

- 25
- 30 El anticuerpo puede tener un macrociclo, para quelar un átomo de un metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida a él por una estructura de puente covalente. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de tecnología de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (CH2, CH3 y dominios bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa ha(n) sido reemplazado(s), o ha sido unidos a la misma por un enlace peptídico, una proteína no de inmunoglobulina funcional, tal como una enzima o una molécula de toxina. El la realización en donde el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o indicadora, los aminoácidos adicionales preferiblemente forman una zona bisagra modificada que contiene uno o dos restos de cisteína a los que puede estar unida la molécula efectora o indicadora.
- 35
- 40

Un grupo efector preferido es una molécula de polímero, que puede unirse al fragmento Fab modificado para incrementar su vida media *in vivo*.

- 45 La molécula de polímero puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo una cadena sustituida opcionalmente lineal o ramificada de polialquileno, polialqueno o polioxialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homopolisacárido o heteropolisacárido.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, comprenden uno o varios grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol y poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o derivados de estos, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol o derivados de éste. Los polímeros naturales particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de éstos. "Derivados" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos tiol tales como maleimididas. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo forme parte en algunos casos del producto como grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

50

55

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero estará generalmente en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y más preferiblemente de 25.000 a 40.000 Da.

El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular tomando como base el uso pretendido del producto. Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo para empleo en el tratamiento de un tumor, puede ser conveniente utilizar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5.000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en circulación, puede ser conveniente utilizar un polímero de alto peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 25.000 Da a 40.000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos comprenden un polímero de polialquileno, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o uno de sus derivados, y especialmente con un peso molecular comprendido en el intervalo de aproximadamente 25.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

10 Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse por enlace covalente al átomo de azufre de un resto de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

15 Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas efectoras o indicadoras unidas a él. Las moléculas efectoras o indicadoras pueden unirse al fragmento de anticuerpo mediante cualquier grupo funcional de la cadena lateral de aminoácidos o aminoácido terminal localizado en el fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o carboxilo libre. Una o más moléculas efectoras o indicadoras puede estar unida a un aminoácido en o hacia el extremo del terminal C de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del anticuerpo.

20 Un polímero activado puede emplearse como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímeros como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halogenocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden adquirirse en el mercado (por ejemplo en Shearwater polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.), o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado utilizando procedimientos químicos convencionales.

25 En cuanto a los restos de poli(etilenglicol) (PEG) de fijación, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

30 Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o indicadora, éste se puede preparar mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora o indicadora antes o después de la reacción con el polímero activado apropiado. Los procedimientos químicos específicos comprenden, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/62331, WO 92/22583, WO 90/195 y WO 89/1476. Alternativamente, cuando la molécula efectora o indicadora es una proteína o polipéptido, el enlace puede conseguirse empleando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP-A-0392745.

40 Preferiblemente, el fragmento Fab modificado proporcionado por el método de la presente invención está PEGilado (es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido por enlace covalente a éste) según el método descrito en el documento EP-A-0948544. Preferiblemente el anticuerpo es un fragmento Fab modificado PEGilado como se muestra en la figura 9. Como se muestra en la figura 2, el fragmento Fab modificado se ha unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la zona bisagra modificada de la cadena pesada un grupo derivado de lisil-maleimida en donde cada uno de los dos grupos amino del resto lisil se ha unido por enlace covalente a éste un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da, de tal manera que el total peso molecular medio de los restos metoxipoli(etilenglicol) es de aproximadamente 40.000 Da, más preferiblemente el grupo derivado de lisil-maleimida es [1-[[[2-[[3-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxopropil]amino]etil]amino]-carbonil]-1,5-pentanodiol]bis (iminocarbonil). Un resto de lisina está unido por enlace covalente a un grupo maleimida. A cada uno de los grupos amino del resto de lisina se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total de la molécula efectora completa es por lo tanto aproximadamente 40.000 Da.

50 Por consiguiente, el método según la presente invención preferiblemente comprende la unión a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida en donde cada grupo amino del resto lisil se ha unido por enlace covalente a éste un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

55 Preferiblemente, en el compuesto mostrado en la Figura 9, la cadena pesada de la parte de anticuerpo tiene la secuencia dada como SEQ. ID. n°: 10 y la cadena ligera tiene la secuencia dada en la SEQ. ID. n°: 9. Este compuesto se denomina en la presente memoria CDP870.

A continuación, la invención se describirá haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de DsbC recombinante expresiva de la estirpe de la célula hospedadora y de anticuerpos recombinantes

5 Para todos los experimentos se utilizó la estirpe celular W3110 de *E. coli* como estirpe celular natural original. Se crearon estirpes celulares que llevan las mutaciones siguientes:

- a. un gen Tsp mutado;
- b. un gen Tsp mutado y que lleva DsbC recombinante;
- c. un gen Tsp mutado y un gen spr mutado;
- d. un gen Tsp mutado y un gen spr mutado y que lleva DsbC recombinante.

10 Generación de la estirpe celular que lleva gen Tsp mutado MXE001 (ΔTsp)

La cepa MXE001 se generó de la manera siguiente:

15 La casete Tsp se desplazó como fragmentos de restricción Sal I, Not I en plásmidos pKO3 igualmente restringidos. El plásmido pKO3 utiliza el mutante sensible a la temperatura del pSC101 origen de replicación (*RepA*) junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar episodios de integración cromosómicos. El gen *sacB* que codifica levansacarasa es letal para el cultivo de *E. coli* en sacarosa y por consiguiente (junto con el marcador de cloranfenicol y origen de pSC101) se utiliza para forzar y seleccionar episodios desintegración y curado de plásmidos. Esta metodología se ha descrito anteriormente (Hamilton *et al.*, 1989, *Journal of Bacteriology*, 171, 4617-4622 y Blomfield *et al.*, 1991, *Molecular Microbiology*, 5, 1447-1457). El sistema pKO3 elimina todos los marcadores selectivos del genoma del hospedador excepto para el gen insertado.

20 Se montaron los plásmidos siguientes.

pMXE191 que comprende el gen Tsp transgénico mutado como se muestra en la SEQ. ID. nº: 15 que comprende marcadores de restricción *EcoR I* y *Ase I*.

25 El plásmido se transformó a continuación en células W3110 electrocompetentes de *E. coli* competente preparadas utilizando el método encontrado en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "*Escherichia coli* electrotransformation," en *Methods in Molecular Biology*, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 105 (1995).

30 Día 1 Se mezclaron 40 μ l de células de *E. coli* con (10 pg) 1 μ l de ADN pKO3 en una cubeta de electroporación de 0,2cm de BioRad refrigerada antes de la electroporación a 2.500 V, 25 μ F y 200 Ω . Se añadieron inmediatamente 1000 μ l de 2xPY, las células se recuperaron por agitación a 250 rpm en una incubadora a 30°C durante 1 hora. Las células se diluyeron 1/10 en serie en 2xPY antes de que se colocaran en placas alícuotas de 100 μ l sobre placas con 2xPY agar-agar que contenían cloranfenicol a 20 μ g/ml precalentadas a 30°C y 43°C. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C y 43°C.

35 Día 2 El número de colonias desarrolladas a 30°C dio una estimación de la eficiencia de electroporación mientras las colonias que sobreviven el cultivo a 43°C representan potenciales episodios de integración. Se seleccionaron colonias aisladas de la placa a 43°C y se volvieron a poner en suspensión en 10 ml de 2xPY. Se sembraron en placas 100 μ l de esta suspensión sobre placas 2xPY con agar-agar que contenían 5% (p/v) de sacarosa precalentada a 30°C para generar colonias aisladas. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C. Día 3 Las colonias aquí representan potenciales episodios simultáneos de desintegración y curado de plásmidos. Si los episodios de desintegración y curado ocurrían al principio del cultivo, entonces la mayor parte de la masa de la colonia será clonal. Se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en placas por duplicado sobre 2xPY agar-agar que contenía ya sea cloranfenicol en 20 μ g/ml o 5% (p/v) de sacarosa. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

40 Día 4 Las colonias que se desarrollan en sacarosa y mueren en cloranfenicol representan potenciales episodios de sustitución cromosómica y curado de plásmidos. Éstas se seleccionaron y detectaron de forma sistemática por RCP con un oligonucleótido específico para mutaciones. Las colonias que generaban una banda positiva a RCP del tamaño correcto se desestimaban para producir colonias aisladas en 2xPY agar-agar que contenía 5% (p/v) de sacarosa y las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

45 Día 5 Se utilizaron colonias aisladas de *E. coli* positivas a RCP, sensibles a cloranfenicol y resistentes a sacarosa para preparar soluciones madre de glicerol, células químicamente competentes y actuar como plantillas de RCP para una reacción de RCP con oligos en los extremos 5' y 3' para generar productos de RCP para secuenciación directa de ADN utilizando Taqpolimerasa.

50 Se probó la estirpe celular MXE001 para confirmar la modificación satisfactoria del ADN genómico que lleva el gen Tsp mutado por ampliación por RCP de la zona del gen Tsp que comprende una secuencia de restricción *Ase I*

artificial que utiliza cebadores oligonucleotídicos. Las zonas ampliadas del ADN se analizaron a continuación por electroforesis en gel antes y después de la incubación con la enzima de restricción Ase I para confirmar la presencia de la secuencia de restricción artificial de Ase I en los genes mutados.

- 5 Se prepararon lisados calentando una colonia aislada de células durante 10 minutos a 95°C en 20 µl de 1x tampón RCP. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, a continuación centrifugación a 13.200 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se marcó como 'lisado celular'.

Se amplió cada cepa utilizando pares de oligos Tsp.

Se amplió el ADN utilizando un procedimiento de RCP convencional.

5 µl	Tampón x10 (Roche)
1 µl	Mezcla dNTP (Roche, mezcla 10 mM)
1,5 µl	oligo 5' (5 pmol)
1,5 µl	oligo 3' (5 pmol)
2 µl	Lisado celular
0,5 µl	Taq ADN polimerasa (Roche 5U/µl)
38,5 µl	H ₂ O

10 Ciclo de RCP.

94°C	1 minuto
94°C	1 minuto)
55°C	1 minuto) repetido durante 30 ciclos
72°C	1 minuto)
72°C	10 minutos

Una vez completadas las reacciones se extrajeron 25 µl a un nuevo tubo de microcentrifugadora para digestión con Ase I. A los 25 µl de reacción de RCP se añadieron 19 µl de H₂O, 5 µl de tampón 3 (NEB), 1 µl de Ase I (NEB, se mezclaron e incubaron a 37°C durante 2 horas.

- 15 A la reacción RCP restante se añadieron 5 µl de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 µl sobre 200 ml de gel de agarosa TAE al 0,8% (Invitrogen) más bromuro de etidio (5 µl de 10 mg/ml de solución madre) y se centrifugaron a 100 volts durante 1 hora. Se cargaron 10 µl de marcador por tamaño (Perfect DNA marker 0,1-12 Kb, Novagen) en el carril final.

- 20 Una vez terminadas las digestiones con Ase I se añadieron 10 µl de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 µl sobre gel de agarosa TAE al 0,8% (Invitrogen) más bromuro de etidio (5 µl de 10 mg/ml de solución madre) y se centrifugaron a 100 volts durante 1 hora. Se cargaron 10 µl de marcador por tamaño (Perfect DNA marker 0,1-12 Kb, Novagen) en el carril final. Se visualizaron ambos geles empleando un UV transluminator.

- 25 El fragmento genómico ampliado presentaba la banda de tamaño correcto de 2,8 Kb para Tsp. Después de digestión con Ase I ésta confirmó la presencia de las secuencias de Ase I introducidas en la cepa MXE001 carente de Tsp pero no en la referencia de W3110.

MXE001: El ADN genómico se amplió utilizando el conjunto cebador Tsp y el ADN resultante se digirió con Ase I para producir bandas de 2,2 y 0,6 Kbps.

W3110 El ADN ampliado por RCP no fue digerido por la enzima de restricción Ase I.

Generación de estirpes celulares que llevan el gen spr mutado y estirpes celulares que llevan el gen Tsp mutado y el gen spr mutado

Se generaron y seleccionaron mutaciones de spr para utilizar un ensayo de complementación.

5 Se mutó el gen spr utilizando el kit de RCP de diversidad de mutagenia aleatoria de Clontech® que introdujo 1 a 2 mutaciones por 1.000 pb. El ADN por RCP con spr mutado se clonó en un vector de expresión inducible [pTTO CDP870] que expresa CDP870 Fab' junto con el mutante spr. Esta ligadura se electrotransformó a continuación en la cepa de MXE001 (Δ Tsp) de *E. coli* preparada utilizando el método encontrado en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "Escherichia coli electrotransformation," en *Methods in Molecular Biology*, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, N.J., 105 (1995). Se utilizó el protocolo siguiente, se añadieron 40 μ l de MXE001 electrocompetente, 10 2,5 μ l de la ligadura (100 pg de ADN) a una cubeta de electroporación de 0,2 cm, se llevó a cabo la electrotransformación utilizando como BioRad Genepulser Xcell con las siguientes condiciones, 2.500 V, 25 μ F y 200 Ω . Después de la electrotransformation se añadió 1ml de SOC (Invitrogen) (precalentado a 37°C) y las células se dejaron recuperar a 37°C durante 1 hora con agitación suave.

15 Las células se sembraron en placas en agar-agar hipotónico (5g/l de extracto de levadura, 2,5g/l de triptona, 15g/l de agar-agar (todo de Difco)) y se incubó a 40°C. Las células que formaban colonias se volvieron a sembrar en placas en HLB a 43°C para confirmar el restablecimiento de la capacidad de desarrollarse en condiciones osmóticas bajas a alta temperatura para la cepa MXE001. Se preparó ADN plásmido a partir de los clones seleccionados y se secuenció para identificar mutaciones de spr.

20 Empleando este método se aislaron cinco mutaciones individuales y una doble en la proteína spr que complementaron el fenotipo de Δ Tsp de la manera siguiente:

1. V98E
2. D133A
3. V135D
4. V135G
- 25 5. G147C
6. S95F e Y115F

30 Las mutaciones individuales identificadas anteriormente y tres mutaciones de la triada catalítica de spr (C94A, H145A, H157A) y W174R se utilizaron para generar nuevas cepas utilizando ya sea la cepa natural W3110 de *E. coli* (genotipo: F- LAM- IN (rmD-rmE)1 rph1 (ATCC n° 27325)) para crear cepas mutadas de spr o la cepa MXE001 del ejemplo 1 para preparar cepas Δ Tsp/spr mutante combinadas.

Las siguientes estirpes celulares mutantes de *E. coli* se generaron utilizando un sistema de vector de reemplazo de genes utilizando el plásmido pKO3 de recombinación homóloga/reemplazo (Link *et al.*, 1997, *Journal of Bacteriology*, 179, 6228-6237), como se describe en el ejemplo 1 para la generación de MXE001.

Tabla 1

Estirpe celular mutante de <i>E. coli</i>	Genotipo	Vectores spr
MXE001	Δ Tsp	-
MXE008	Δ Tsp, spr D133A	pMXE339, pK03 spr D133A (-Sall)
MXE009	Δ Tsp, spr H157A	pMXE345, pK03 spr H157A (-Sall)
MXE010	spr G147C	pMXE338, pK03 spr G147C (-Sall)
MXE011	spr C94A	pMXE343, pK03 spr C94A (-Sall)
MXE012	spr H145A	pMXE344, pK03 spr H145A (-Sall)
MXE013	spr W 174R	pMXE346, pK03 spr W174R (-Sall)
MXE014	Δ Tsp, spr V135D	pMXE340, pK03 spr V135D (-Sall)
MXE015	Δ Tsp, spr V98E	pMXE342, pK03 spr V98E (-Sall)
MXE016	Δ Tsp, spr C94A	pMXE343, pK03 spr C94A (-Sall)
MXE017	Δ Tsp, spr H145A	pMXE344, pK03 spr H145A (-Sall)
MXE018	Δ Tsp, spr V135G	pMXE341, pK03 spr V135G (-Sall)

Las casetas de integración de spr mutante se movieron como fragmentos de restricción Sal I, Not I en plásmidos pK03 restringidos de manera similar.

- 5 El plásmido utiliza el mutante sensible a la temperatura del pSC101 origen de replicación (*RepA*) junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar episodios de integración cromosómicos. El gen *sacB* que codifica levansacarasa es letal para el cultivo de *E. coli* en sacarosa y por consiguiente (junto con el marcador de cloranfenicol y origen de pSC101) se utiliza para forzar y seleccionar episodios de desintegración y curado de plásmidos. Esta metodología se ha descrito anteriormente (Hamilton *et al.*, 1989, *Journal of Bacteriology*, 171, 4617-4622 y Blomfield *et al.*, 1991, *Molecular Microbiology*, 5, 1447-1457). El sistema pK03 elimina todos los marcadores selectivos del genoma del hospedador excepto para el gen insertado. Se montaron los vectores pK03 enumerados a continuación, que comprenden los genes spr mutados incluida una mutación imperceptible dentro de la secuencia de spr que elimina una secuencia de restricción Sall para la identificación del clon

pMXE336, pK03 spr S95F (-Sall)

- 15 pMXE337, pK03 spr Y115F (-Sall)
 pMXE338, pK03 spr G147C (-Sall)
 pMXE339, pK03 spr D133A (-Sall)
 pMXE340, pK03 spr V135D (-Sall)
 pMXE341, pK03 spr V135G (-Sall)
- 20 pMXE342, pK03 spr V98E (-Sall)
 pMXE343, pK03 spr C94A (-Sall)
 pMXE344, pK03 spr H145A (-Sall)
 pMXE345, pK03 spr H157A (-Sall)
 pMXE346, pK03 spr W174R (-Sall)

Estos plásmidos se transformaron a continuación en células W3110 de *E. coli* químicamente competentes preparadas empleando el método encontrado en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "Escherichia coli electrotransformation," en *Methods in Molecular Biology*, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 105 (1995) o en la cepa MXE001 del ejemplo 1 para preparar cepas Δ Tsp/spr mutante combinadas, como se muestra en la Tabla 1.

Día 1 Se mezclaron 40 μ l de células *E. coli* electrocompetentes o células MXE001 con (10 pg) 1 μ l de ADN pKO3 en una cubeta de electroporación de 0,2cm BioRad refrigerada antes de la electroporación a 2.500 V, 25 μ F y 200 Ω . Se añadieron inmediatamente 1000 μ l de 2xPY, las células se recuperaron por agitación a 250 rpm en una incubadora a 30°C durante 1 hora. Las células se diluyeron 1/10 en serie en 2xPY antes de que se colocaran en placas alícuotas de 100 μ l sobre placas con 2xPY agar-agar que contenían cloranfenicol a 20 μ g/ml precalentado a 30°C y 43°C. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C y 43°C.

Día 2 El número de colonias cultivadas a 30°C dio una estimación de la eficiencia de electroporación mientras las colonias que sobreviven el cultivo a 43°C representan potenciales episodios de integración. Se seleccionaron colonias aisladas de la placa a 43°C y se volvieron a poner en suspensión en 10 ml de 2xPY. Se sembraron en placas 100 μ l de esta suspensión sobre placas 2xPY con agar-agar que contenían de sacarosa al 5% (p/v) precalentada a 30°C para generar colonias aisladas. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C. Día 3 Las colonias aquí representan potenciales episodios simultáneos de desintegración y curado de plásmidos. Si los episodios de desintegración y curado ocurrían al principio del cultivo, entonces la mayor parte de la masa de la colonia será clonal. Se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en placas por duplicado sobre 2xPY agar-agar que contenía ya sea cloranfenicol en 20 μ g/ml o 5% (p/v) de sacarosa. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

Día 4 Las colonias que se desarrollan en sacarosa y mueren en cloranfenicol representan potenciales episodios de sustitución cromosómica y curado de plásmidos. Éstas se seleccionaron y detectaron de forma sistemática por RCP más producto de la digestión de restricción para la pérdida de una enzima Sall. Las colonias que generaban una banda positiva a RCP del tamaño correcto y resistencia a la digestión por Sall se desestimaban para producir colonias aisladas en 2xPY agar-agar que contenía 5% (p/v) de sacarosa y las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

Día 5 Se utilizaron colonias aisladas de *E. coli* positivas a RCP, sensibles a cloranfenicol y resistentes a sacarosa para preparar soluciones madre de glicerol, células químicamente competentes y actuar como plantillas de RCP para una reacción de RCP con oligos en los extremos 5' y 3' para generar productos de RCP para secuenciación directa de ADN utilizando Taqpolimerasa para confirmar la mutación correcta.

Generación de plásmido para la expresión de Fab' y DsbC

Se montó un plásmido que contenía secuencias tanto de la cadena pesada como de la ligera de un Fab' anti-FNT y la secuencia codificadora DsbC.

Se creó un mensaje bicistrónico del fragmento Fab' anti-FNT α (denominado CDP870) descrito en el documento WO01/94585. El cistrón aguas arriba codificó la cadena ligera del anticuerpo (SEQ. ID. n°: 9) mientras que el cistrón aguas abajo codificó la cadena pesada del anticuerpo (SEQ. ID. n°: 10). Una secuencia de DNA que codifica el péptido señal OmpA se fusionó al extremo 5' del DNA que codifica para cada cadena ligera y cadena pesada para permitir secreción eficaz al periplasma. La secuencia intergénica (SIG) 2 se utilizó como se muestra en la SEQ. ID. n°: 16.

El plásmido pDPH358 (pTTO 40.4 CDP870 IGS2), un vector de expresión para el Fab' CDP870 (un Fab' anti-FNT) y DsbC (un polipéptido periplásmico), se construyeron empleando metodologías convencionales de clonación con restricción que pueden encontrarse en Sambrook *et al.* 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press, N.Y. El plásmido pDPH358 contenía los elementos siguientes; una secuencia de activador *tac* potente y de operador *lac*. El plásmido contenía una única secuencia de restricción EcoRI después de la zona codificadora de la cadena pesada de Fab', seguida de una secuencia no codificadora y a continuación una única secuencia de restricción NdeI. El gen DsbC se clonó por RCP utilizando ADN cromosómico W3110 en bruto como plantilla de tal manera que el producto de la RCP codificó una secuencia EcoRI en 5' seguido de un enlace fuerte al ribosoma, seguido del codón de inicio natural, secuencia señal y secuencia madura de DsbC, terminando en una etiqueta His en el terminal C y por último una secuencia NdeI no codificadora. El fragmento EcoRI-NdeI de RCP se restringió y ligó en el vector de expresión de tal manera que los tres polipéptidos: cadena ligera de Fab', cadena pesada de Fab' y DsbC se codificaron en un solo ARNm policistrónico.

Los genes de cadena ligera y cadena pesada del Fab y el gen DsbC se transcribieron como un solo mensaje policistrónico. El ADN que codifica el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* se fusionó al extremo 5' de las secuencias génicas tanto de la cadena ligera como de la pesada, que dirigían la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó utilizando un terminador doble de transcripción *rrnB t1t2*. El gen *lacIq* codificó la proteína represora Lac I constitutivamente expresada. Esta transcripción reprimida procedente del activador *tac* hasta la desrepresión fue provocada por la presencia de la alolactosa o IPTG. El origen de la

replicación utilizada fue p15A, que mantuvo un número bajo de copia. El plásmido contenía un gen de resistencia a la tetraciclina para la selección del antibiótico.

Expresión de Fab' anti-FNT y DsbC

5 La cepa MXE008 se transformó con el plásmido que codifica la cadena ligera de Fab', la cadena pesada de Fab' y DsbC.

La transformación de la cepa se llevó a cabo utilizando el método encontrado en Chung C.T. *et al.* Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS* 86:2172-2175 (1989).

Expresión de Fab' anti-FNT

10 La cepa MXE008 se transformó con el plásmido pMXE117 (pTTO CDP870 o 40.4 IGS2), un vector de expresión para el Fab' CDP870 (un Fab' anti-FNT que tiene una secuencia de cadena ligera mostrada en la SEQ. ID. n°: 9 y una secuencia de cadena pesada mostrada en la SEQ. ID. n°: 10), que se construyó utilizando metodologías convencionales de clonación de restricción que pueden encontrarse en Sambrook *et al.* 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press, N.Y. El plásmido pMXE117 (pTTO CDP870 o 40.4 IGS2) contenían los elementos siguientes; una secuencia de activador *tac* potente y de operador *lac*. Los genes de cadena ligera y pesada de Fab' se transcribieron como un solo mensaje bicistrónico. El ADN que codifica el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* se fusionó al extremo 5' de las secuencias génicas tanto de la cadena ligera como de la pesada, que dirigían la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó utilizando un terminador doble de transcripción *rrnB t1t2*. El gen *facIq* codificó la proteína represora Lac I constitutivamente expresada. Esta transcripción reprimida procedente del activador *tac* hasta la desrepresión fue provocada por la presencia de la alolactosa o IPTG. El origen de replicación utilizado fue p15A, que mantuvo un número bajo de copias. El plásmido contenía un gen de resistencia a la tetraciclina para la selección del antibiótico.

La transformación de las cepas se llevó a cabo utilizando el método encontrado en Chung C.T. *et al.* Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS* 86:2172-2175 (1989).

Ejemplo 2 - Cultivo de célula hospedadora que expresan el anticuerpo recombinante Fab' anti-FNT

25 La cepa MXE008 producida en el ejemplo 1 se utilizó en experimentos de fermentación para expresar el Fab' anti-FNT α

MXE008 que expresa Fab' anti-FNT y DsbC se fermentó empleando condiciones y medio convencionales de fermentación. Después de la fermentación la muestra resultante de células hospedadoras se sometió a centrifugación y el sedimento celular se congeló para almacenamiento.

30 Ejemplo 3 - Extracción de Fab' anti-FNT α procedente de la cepa de *E. coli* y ajuste de pH

El sedimento celular congelado del ejemplo 2 se descongeló a continuación y se volvió a poner en suspensión en tampón de extracción (Tris 0,1M/EDTA 10 mM pH 7,4). La extracción se llevó a cabo durante la noche a 60°C.

Después de la etapa de extracción la muestra de extracción se centrifugó durante 1 hora a 4.200 rpm a 4°C. Tras la centrifugación la muestra se clarificó por filtración a 0,45 μ m+0,22 μ m.

35 Después de la filtración, el extracto de la muestra de células hospedadoras resultante que tiene un pH de 6,9 se dividió en 3 alícuotas de 10 ml y se ajustó a pH 5,0, 4,5 o 3,0 utilizando ácido acético glacial al 30% (v/v). Una alícuota aparte se mantuvo a pH 6,9 como muestra de referencia.

40 Como puede verse en la figura 1, se observaron mayores niveles de precipitación a medida que disminuía el pH. La mayor parte de la precipitación de proteínas de célula hospedadora se observó a pH 3,0, seguida de pH 4,5 y a continuación pH 5,0.

Ejemplo 4 - Análisis de extractos de muestras de células hospedadoras después del ajuste de pH por HPLC en fase inversa

45 Se tomaron muestras de cada extracto de muestras de célula hospedadora después del ajuste de pH a pH 5,0, 4,5 o 3,0 o la referencia (sin ajuste de pH, pH 7) a lo largo del tiempo en los tiempos (T)=0, T=1 hora, T=2 horas, T=4,5 horas, T=8 horas y T=24 horas, y análisis en tiempo real se llevó a cabo por HPLC en fase inversa. La HPLC en fase inversa permite la separación de proteínas basándose en la hidrofobicidad y se llevó a cabo utilizando una columna de HPLC adecuada (Poroshell™ 300SB-C8, 5 micras, 2,1x75 mm de Agilent Technologies). Se filtraron las muestras (0,22 μ m) antes del análisis.

50 Los resultados se muestran en las figuras 2, 3, 5 y 6. La figura 2 presenta los cromatogramas superpuestos para el análisis de HPLC en fase inversa a T=0 (T=0 significa tan pronto como sea posible para realizar el análisis tras el ajuste de pH, normalmente alrededor de 7 minutos tras el ajuste de pH) para el extracto de la muestra de células hospedadoras tras el ajuste de pH. La figura 3 presenta los cromatogramas individuales para el análisis de HPLC en

fase inversa a T=0 para el extracto de la muestra de células hospedadoras tras el ajuste de pH. Los picos correspondientes a la cadena ligera (CL) del Fab', a la cadena pesada (CP) del Fab', al Fab' completo, a DsbC-his (DsbC marcada con his) y a la proteína de fijación al dipéptido (DBP) se muestran para el pH 7 y para el ajuste de pH a pH 3,0, pH 4,5 y pH 5,0. En las figuras 2 y 3 puede observarse que la cantidad de DsbC-his es menor después
5 del ajuste de pH a pH 5 en comparación con la referencia a pH 7, la cantidad de DsbC-his se reduce considerablemente además tras el ajuste de pH a pH 4,5 o a pH 3,0. Puede apreciarse además que la cantidad de DBP se reduce considerablemente tras el ajuste de pH a pH 3. El pI de DBP es 5,7. Por consiguiente, en el extracto de célula hospedadora el pH tenía que reducirse considerablemente para producir precipitación de DBP. La cantidad de Fab' no se ve afectada considerablemente por el ajuste de pH.

10 La figura 5 presenta el área total del pico para DsbC-his a partir del cromatograma de la HPLC en fase inversa tras el ajuste de pH a pH 3,0, 4,5 y 5,0. Como se aprecia en las figuras 2 y 3, la cantidad de DsbC se reduce tras el ajuste a pH 5,0 y se reduce más tras el ajuste a pH 4,5 o 3,0.

La figura 6 presenta el área total del pico para DBP a partir del cromatograma de la HPLC en fase inversa tras el ajuste de pH a pH 3,0, 4,5 y 5,0. Como se aprecia en las figuras 2 y 3, la cantidad de DBP se reduce tras el ajuste a
15 pH 3,0.

Una solución purificada de DsbC-his se obtuvo del extracto de células hospedadoras de la cepa MXE008 por análisis cromatográfico de intercambio catiónico en modo mixto de esta solución purificada que comprende DsbC-his se llevó a cabo a pH 7 y a pH 3,0 después de T=0, 1, 8 y 24 horas. Los resultados se muestran en la figura 4 que presenta los cromatogramas del análisis de la HPLC en fase inversa de la purificada solución que comprende DsbC-
20 his a pH 7 y a pH 3,0 después de T=0, 1, 8 y 24 horas. A partir de la figura 4 puede apreciarse que el ajuste de pH no tuvo efecto sobre la precipitación y eliminación de DsbC-his de la solución.

Ejemplo 5 - Análisis de muestras por SDS-PAGE

Se llevó a cabo un análisis SDS-PAGE no reductor tras un almacenamiento prolongado a pH 7, pH 5,0, pH 4,5 y pH 3,0. La figura 7 presenta el análisis en gel SDS-PAGE. En la figura 7 puede apreciarse que la cantidad de DBP se reduce tras el ajuste de pH a pH 3. La DsbC y la cadena pesada (CP) del Fab' muestran al mismo peso molecular en el gel pero puede apreciarse que la banda para DsbC y CP se reduce después del ajuste de pH a pH 5, pH 4,5 y pH 3 debido a la reducción en DsbC confirma que la cantidad de DsbC-his y DBP se reduce tras el ajuste de pH.

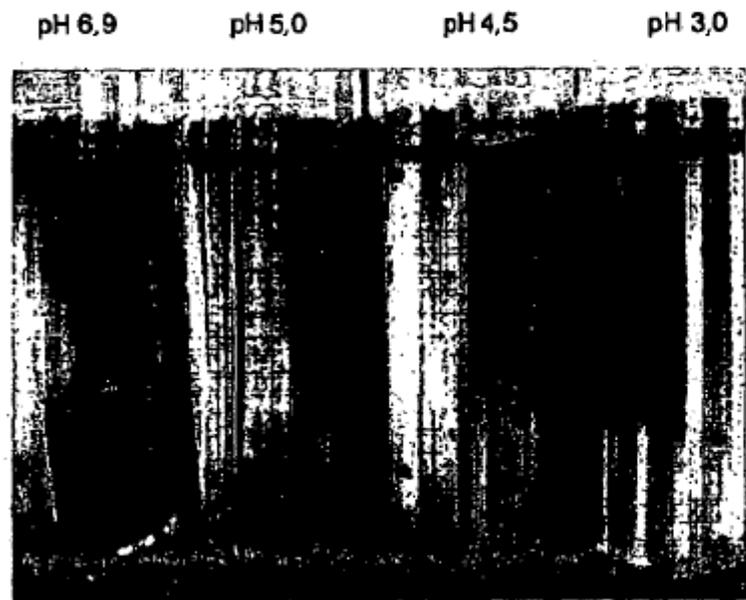
El CDP870 del Fab' anti-FNT analizado en los ejemplos anteriores tras el ajuste de pH a pH 4,5 se ha analizado por análisis Biacore y se ha descubierto que tienen afinidad a FNT retenida. (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína recombinante procedente de una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas o un extracto de la misma en donde dicha célula hospedadora expresa una proteína recombinante y una disulfuro isomerasa recombinante DsbC; en donde el método comprende:
- 5 a) ajustar el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma a un pH de 5 o inferior para precipitar la disulfuro isomerasa recombinante; y
- b) separar la disulfuro isomerasa recombinante precipitada de la proteína recombinante para producir una muestra de proteína recombinante.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH de 4,5 o inferior.
3. El método según la reivindicación 2, en donde el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH de 4,5 a 3,0.
4. El método según la reivindicación 2, en donde el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH de 3 o inferior.
- 15 5. El método según la reivindicación 4, en donde en la etapa a) la proteína de fijación al dipéptido de la célula hospedadora se precipita además y en la etapa b) la proteína de fijación al dipéptido de la célula hospedadora se separa además de la proteína recombinante.
6. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la disulfuro isomerasa comprende una etiqueta de histidina.
- 20 7. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la célula hospedadora bacteriana gram-negativa es *E. coli*.
8. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la célula hospedadora comprende Fkpa y/o Skp.
9. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa a) el pH de la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se ajusta a un pH inferior a 5 utilizando ácido acético glacial.
- 25 10. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra de células hospedadoras o de un extracto de la misma se mantiene a un pH de 5 o menos durante una hora o menos.
11. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la separación en la etapa b) comprende centrifugación y/o filtración.
12. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde tras la etapa b) el método comprende una etapa de purificación adicional para someter la muestra de proteína recombinante a cromatografía.
- 30 13. El método según la reivindicación 11, en donde la cromatografía es la cromatografía de intercambio iónico.
14. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde después de la etapa b) el pH de la muestra de proteína recombinante se ajusta a un pH de 5 a 7.
15. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde antes de la etapa a) se añade un tampón de extracción a la muestra de células hospedadoras o a un extracto de la misma y la muestra de células hospedadoras o un extracto de la misma se somete a una etapa de tratamiento térmico.
- 35 16. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína recombinante tiene un pI de 6 a 9.
17. El método según la reivindicación 16, en donde la proteína recombinante tiene un pI de 8 a 9.
18. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo recombinante.
- 40 19. El método según la reivindicación 18, en donde el anticuerpo recombinante es un anticuerpo monoclonal, humanizado o híbrido, o uno de sus fragmentos, tal como uno de sus fragmentos de fijación.
20. El método según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en donde el anticuerpo recombinante es un fragmento Fab o Fab'.
- 45 21. El método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde el anticuerpo recombinante es específico para FNT α humano.

22. El método según la reivindicación 21, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia dada en SEQ. ID. n°: 1 para RDCH1, SEQ. ID. n°: 2, para RDCH2 y SEQ. ID. n°: 3 para RDCH3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia dada en SEQ. ID. n°: 4 para RDCL1, SEQ. ID. n°: 5 para RDCL2 y SEQ. ID. n°: 6 para RDCL3.
23. El método según la reivindicación 22, en donde el anticuerpo comprende secuencia de la zona variable de la cadena ligera dada en SEQ. ID. n°: 7 y la zona variable de la cadena pesada dada en SEQ. ID. n°: 8.
24. El método según la reivindicación 23, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia dada en SEQ. ID. n°: 10 y una cadena ligera que tiene la secuencia dada en SEQ. ID. n°: 9.
25. Utilización de una etapa de ajuste del pH de una muestra de células hospedadoras bacterianas gram-negativas o de uno de sus extractos transformada con un vector de expresión que codifica una proteína recombinante a un pH de 5 o menos para precipitar disulfuro isomerasa recombinante de célula hospedadora, separar la disulfuro isomerasa recombinante de célula hospedadora precipitada de la proteína recombinante y producir una muestra de proteína recombinante purificada.

Figura 1



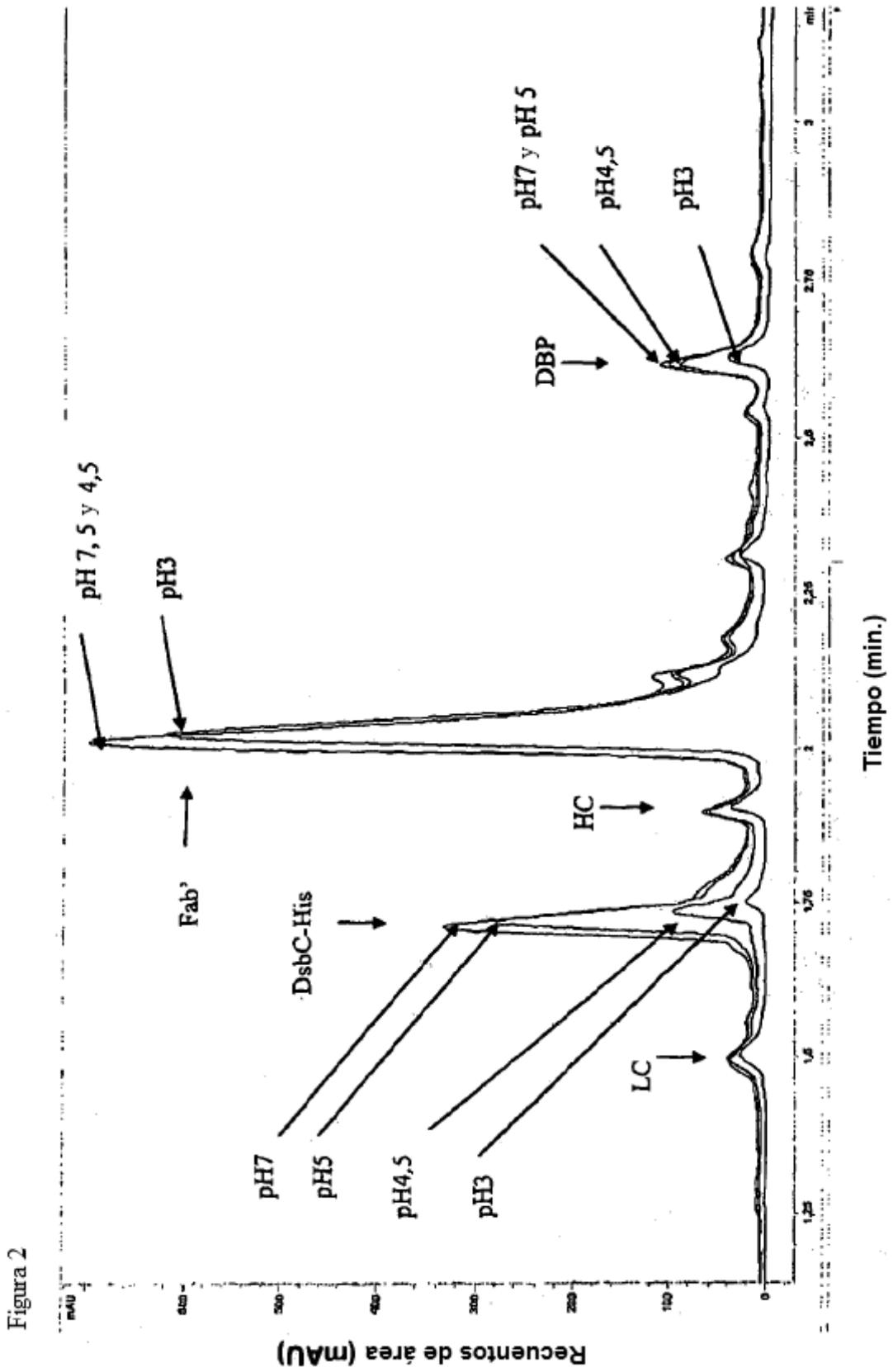


Figura 3

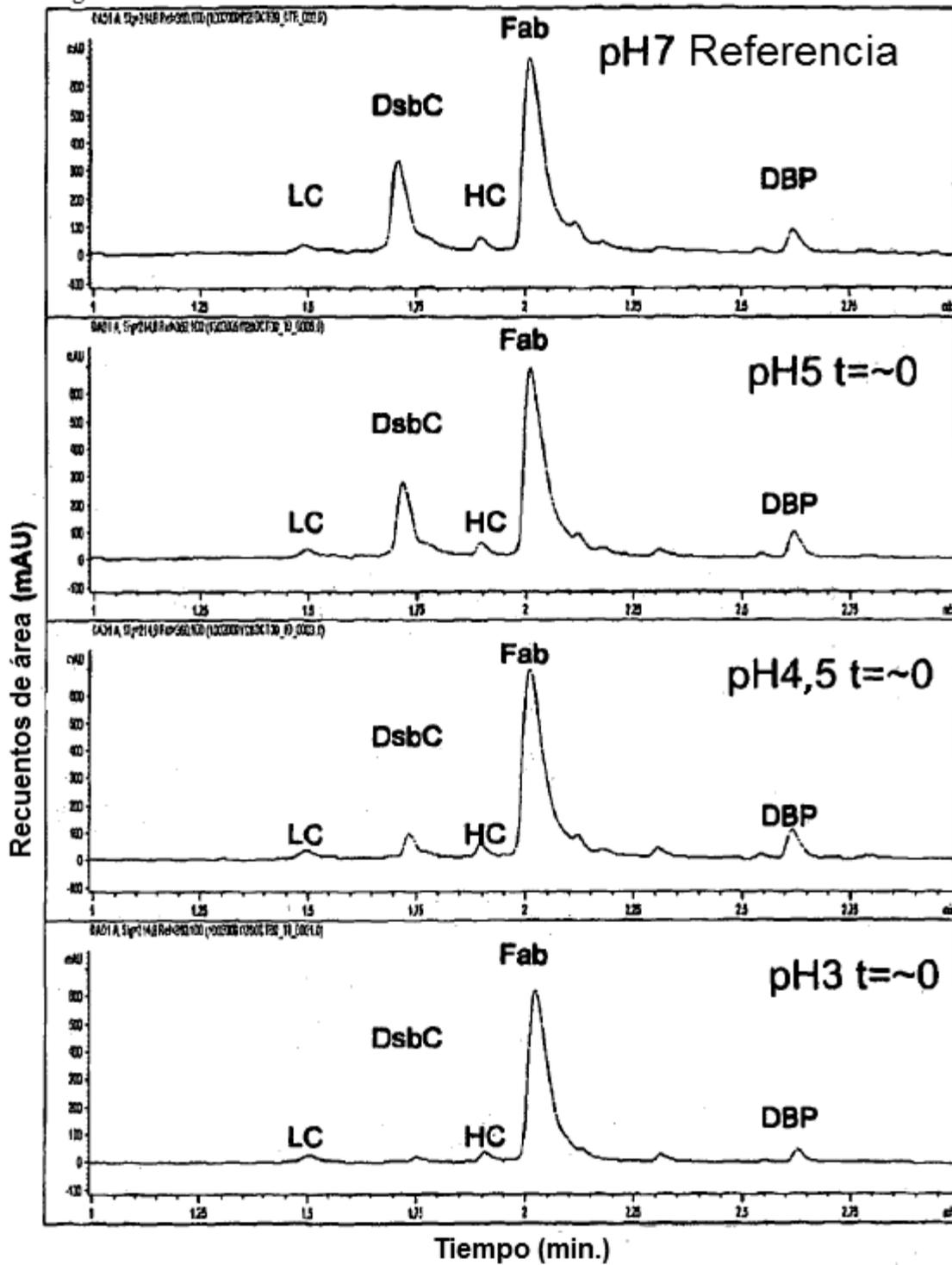


Figura 4

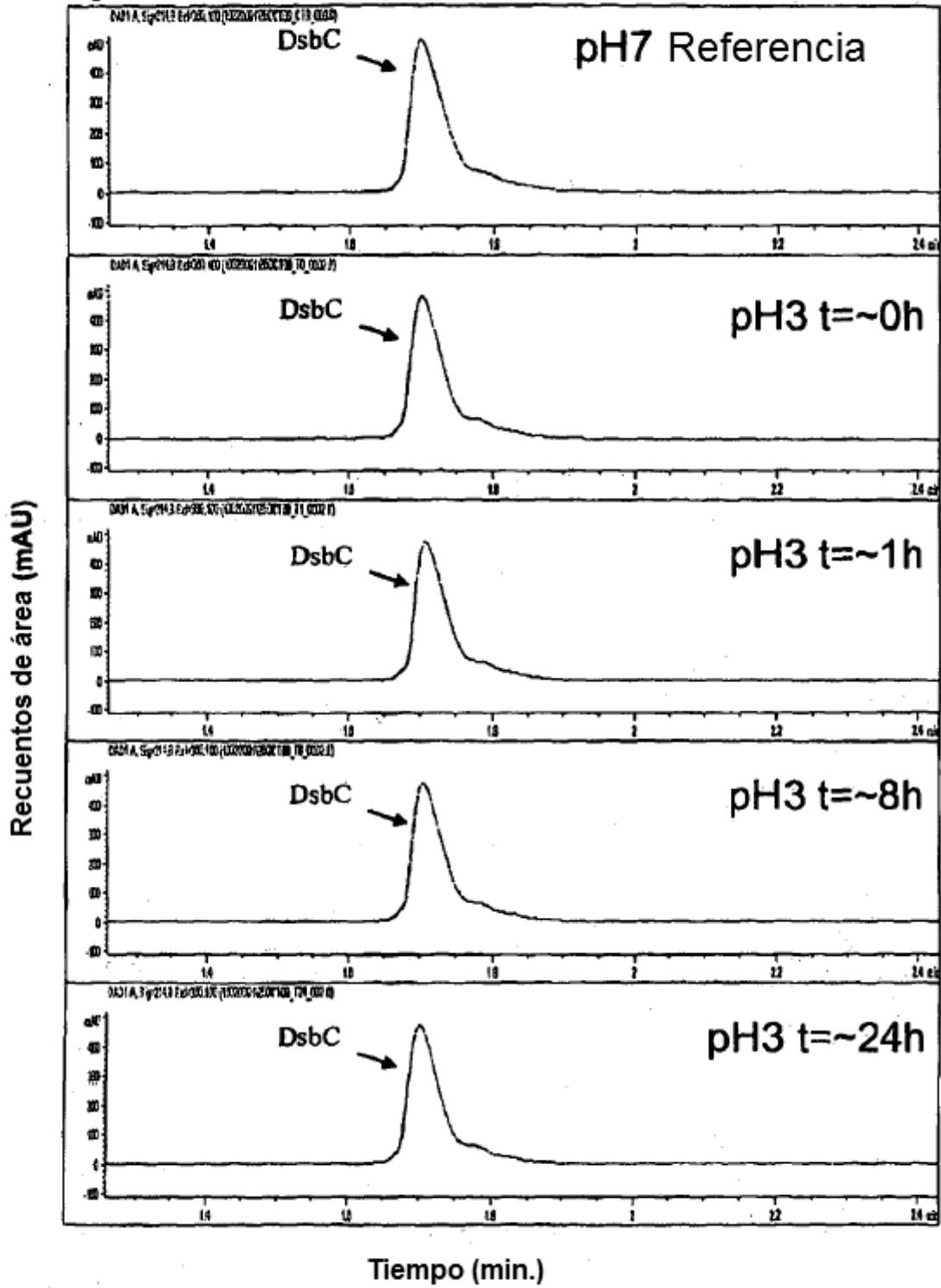


Figura 5

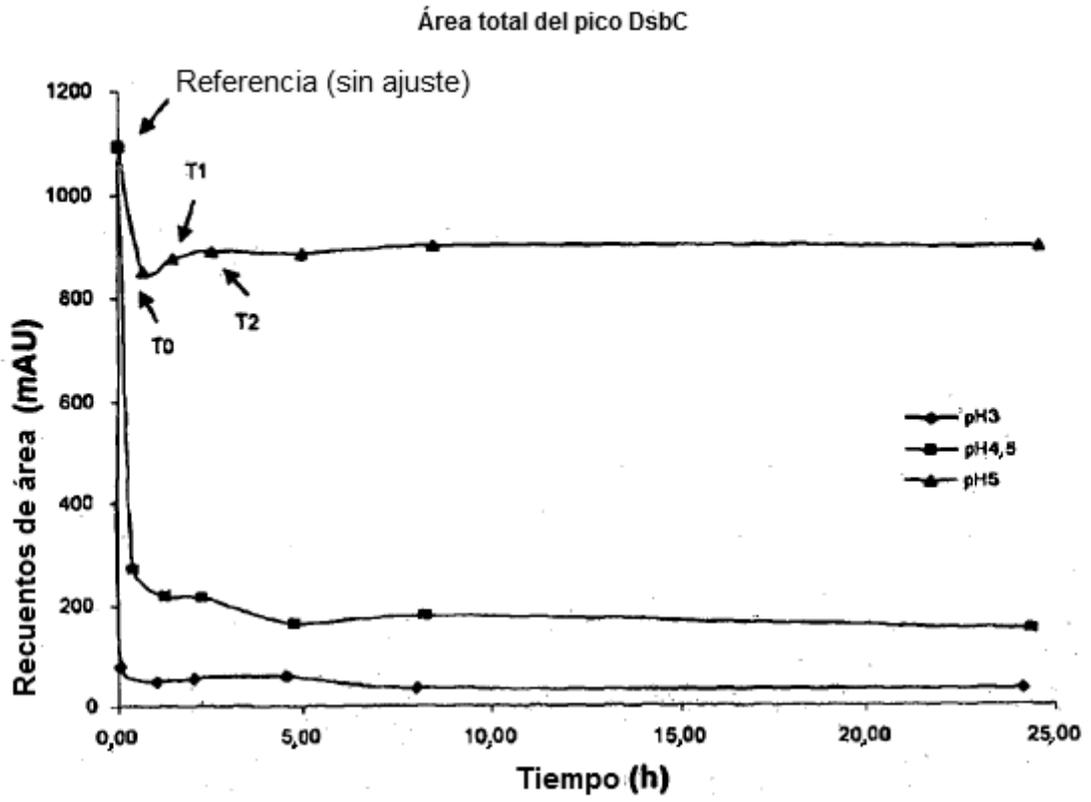


Figura 6

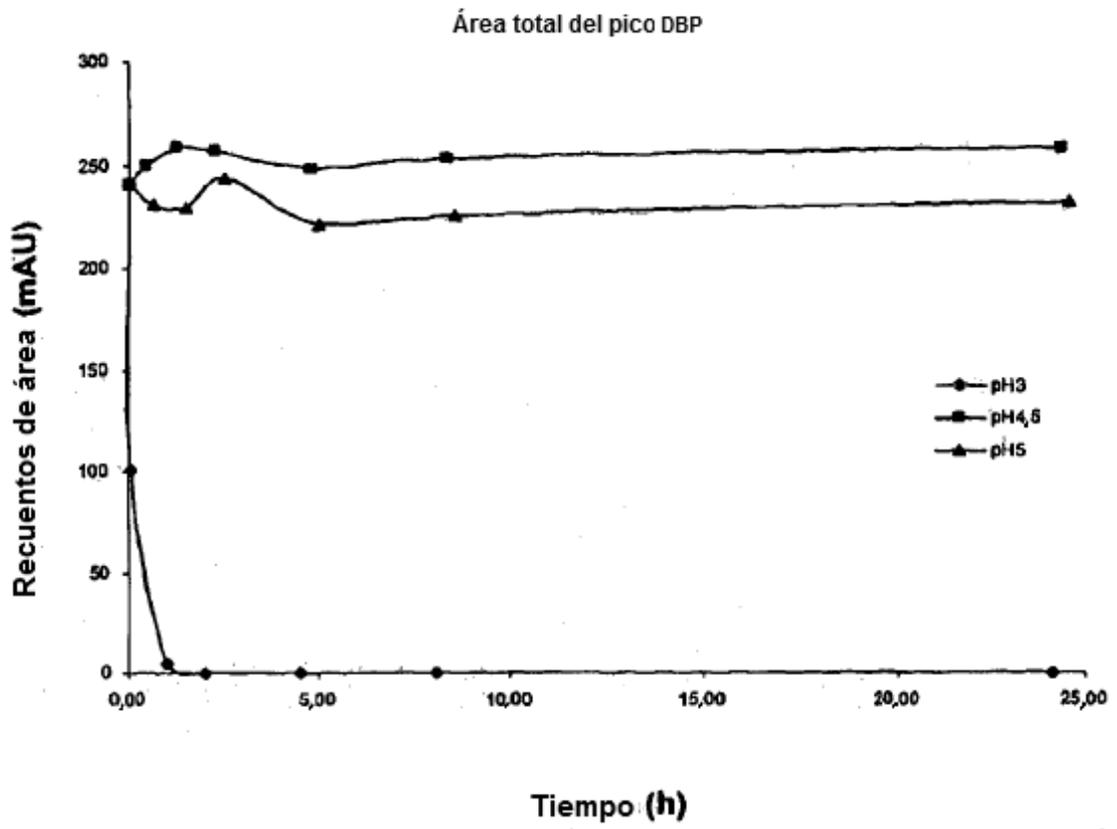
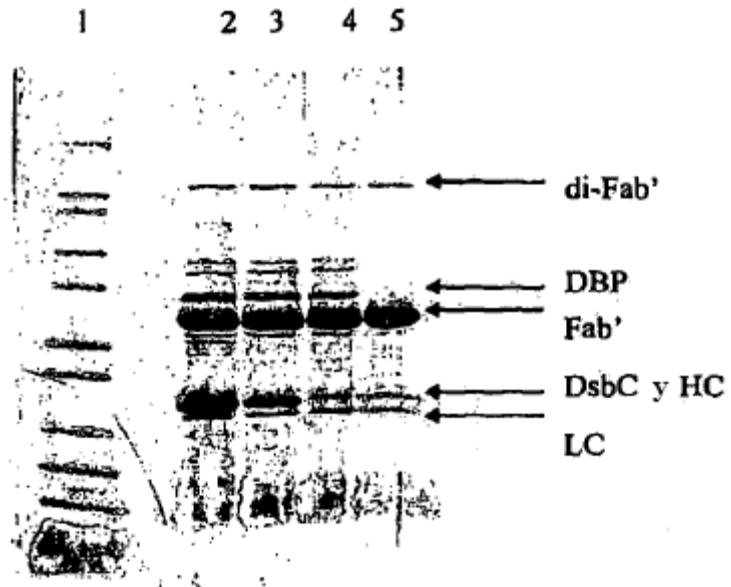


Figura 7



Vía	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	Extracto clarificado de la cepa MXE008 de referencia (pH 6,9)
3	Extracto clarificado de la cepa MXE008 ajuste de pH a 5,0
4	Extracto clarificado de la cepa MXE008 ajuste de pH a 4,5
5	Extracto clarificado de la cepa MXE008 ajuste de pH a 3,0

Figura 8

SEQ ID n° : 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH1 de CDP870.

Asp Tyr Gly Met Asn

SEQ ID n° : 2 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH2 de CDP870

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

SEQ ID n° : 3 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH3 de CDP870.

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

SEQ ID n° : 4 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL1 de CDP870.

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

SEQ ID n° : 5 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL2 de CDP870.

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

SEQ ID n° : 6 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de CDP870.

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

SEQ ID n° : 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera CDP870

**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
Glu Ile Lys**

SEQ ID n° :8 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDP870.

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID n° : 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera CDP870 injertada con Fab anti-FNT α

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

SEQ ID n° : 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada CDP870 injertada con Fab anti-FNT α .

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala
 Ala

SEQ ID n° : 11 es la secuencia nucleotídica de DsbC etiquetada con his.

atgaagaaag gttttatggt gtttactttg ttageggcgt tttcaggcgt tgctcaggct
 60
 gatgacgcgg caattcaaca aacgtagcc aaaatgggca tcaaaagcag cgatattcag
 120
 cccgcgcctg tagctggcat gaagacagtt ctgactaaca gcggcgtggt gtacatcacc
 180
 gatgatggta aacatatcat tcaggggcca atgtatgacg ttagtggcac ggctccggtc
 240
 aatgtcacca ataagatgct gttaaagcag ttgaaatgcg tgaaaaaga gatgatcgtt
 300
 tataaagcgc cgcaggaaaa acacgtcatc accgtgttta ctgatattac ctgtggttac
 360
 tgccacaaac tgcattgagca aatggcagac tacaacgcgc tgggatcac cgtgcgttat
 420
 cttgctttcc cgcgccaggg gctggacagc gatgcagaga aagaaatgaa agctatctgg
 480
 tgtgcaaaag ataaaaaaa agcgtttgat gatgtgatgg caggtaaaag cgtcgcacca
 540
 gccagttgcy acgtggatat tgccgacat tacgcacttg gcgtccagct tggcgtagc
 600
 ggtactccgg cagttgtgct gagcaatggc acacttgctc cgggttacca gccgccgaaa
 660

gagatgaaag aatttctcga cgaacaccaa aaaatgacca gcggtaaaca ccatcaccat
720

SEQ ID n°: 12 es la secuencia de aminoácidos de DsbC etiquetada con his.

MKKGFMFLTL LAAFSGFAQA DDAAIQQTLA KMGIKSSDIQ PAPVAGMKTV LTNSGVLYIT
DDGKHIQGP MYDVSGTAPV NVTNKMLLKQ LNALEKEMIV YKAPQEKHVI TVFTDITCGY
CHKLHEQMAD YNALGITVRY LAFPRQGLDS DAEKEMKAIW CAKDKNKAFD DVMAGKSVAP
ASCDVDIADH YALGVQLGVS GTPAVVLSNG TLVPGYQPPK EMKEFLDEHQ KMTSGKHHHH
HH

SEQ ID n°: 13 es la secuencia del gen spr natural que incluye la secuencia señal que es los restos de los primeros 26 aminoácidos

Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro Ala Ile Ala Val Ala
Val Leu Leu Ser Ala Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg
Ala Val Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg
Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr
Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg
Glu Gln Phe Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser
Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly
Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val
Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu
Ser Arg Ser

SEQ ID n°: 14 es la secuencia del gen spr natural sin la secuencia señal.

Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val Gly Ser Glu
Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg Asn Val Asp Val
Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser
Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly
Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser Val Ser Arg Ser Asn
Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr
Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn
Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser

SEQ ID nº : 15 es la secuencia de ADN de un gen Tsp transgénico mutado que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codón de inicio.

atgaattcgt ttttaggctt accgcgcttag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60
 taattgtaga agatatcacg cgtgctgac aaattccggt attaaaggaa gagacgcagc 120
 atgcgacggg aagtgagcgc gtaacgtcgc gctcaccgc ttctcattat cgccagttcg 180
 acctcgaica ggcaatttcg gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctcgattaca 240
 gccacaacgt gctgctggca agcgaatgtg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag 300
 gcgatgaact gcgttcaggc aaactcgacg tttctacga tctctacaat ctggcgcaaa 360
 agcgccggtt tgagcgttac cagtacgctt tctcggctact ggaaaagccg atggattca 420
 ccggcaacga cacttataac ctgaccgca gcaaagcgc ctggccgaaa aacgaggctg 480
 agttgaacgc gctgtgggac agtaaagta aattcgacga gtaagcctg aagctgacag 540
 gaaaaacgga taaagaaatt cgtgaaacc tgactcgccg ctacaaattt gccattcgtc 600
 gtctggcgca aaccaacagc gaagatgtt tctcgtggc aatgacggcg ttgctcgtg 660
 aaatcgacc gcataccaac tatcttccc cgcgtaafac cgaacagttc aacctgaaa 720
 tgagttgtc gctggaaggc attggcgagc tctcgtcaat ggatgatgac tacaccgta 780
 tcaattcga ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca 840
 aaattgtcgg tgttggtcaa acaggcaagc cgaatggtga cgtgattggc tggcgtctg 900
 atgatgtggt tgccttaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaaattttac 960
 ctgctggtaa agggaccaag acccgtactg taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctc 1020
 aagaccgocg gggtaaaatg tgggtgaaga ccgtcggtaa agagaaagtc ggcgtgctgg 1080
 atattccggg ctctatgtg gggtgacag acgatgcaa agtgcaactg cagaaactgg 1140
 aaaaacagaa tctcagcagc gtcacatcg acctgcgtag caatggcggg gggcggttaa 1200
 ctgaagccgt atcgtctcc ggtctgtta tctcgcggg tccattgtt caggtccgcg 1260
 ataacaacgg caaggtcgt gaagatagcg ataccgacgg acaggtttc tataaaggcc 1320
 cgctggtggt gctggtgac cgctcagtg ctccggctc agaaatctt gccgcggcaa 1380
 tgcaggatta cgtcgtgocg ctggtgtgg gtaaccgac gtttggtaaa ggcaccgtc 1440
 agcaataccg ttcattgaac cgtattfac atcagatgtt acgtcctgaa tggccagcgc 1500
 tgggtctgt gcagtacag atccagaaat tctatcgcgt taacggcggc agtacgcaac 1560

gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg 1620
agaaattcga agataacgcg ctgccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat 1680
caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcgca 1740
aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcg ctccaacgct atgaaggaca 1800
agcgcaatat cgtttctctg aattacgctg tgcgtgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
cgacgcgtct ggcgcgttg aacgaacgct ttaaaccgca aggtaaaccg gagttgaaga 1920
aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacggatga 1980
atatcgcaact cgatctggcg aagcttgaaa aagccagacc cgcggaacaa cccgctcccg 2040
tcaagtaa 2048

SEQ ID n°: 16 muestra la casete oligonucleotídica que codifica la secuencia intergénica 2 (SIG2) para la expresión del Fab de *E. coli*

gagtcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt taaatgaag aagactgcta 60
tagcaattg 69

Figura 9

