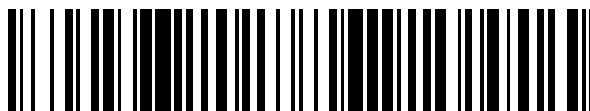


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 358**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2003** **E 03756575 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015** **EP 1554384**

54 Título: **Células hospedadoras E. coli con proteínas periplásmicas de fijación al fosfato phos/psts modificadas y método de preparación de fab recombinantes**

30 Prioridad:

16.10.2002 GB 0224082

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

17.07.2015

73 Titular/es:

**UCB PHARMA, S.A. (100.0%)
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:

**HUMPHREYS, DAVID, PAUL;
CHAPMAN, ANDREW, PAUL;
ROBINSON, MARTYN, KIM y
SPITALI, MARIANGELA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 541 358 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

Células hospedadoras *E. coli* con proteínas periplásmicas de fijación al fosfato phos/psts modificadas y método de preparación de fab recombinantes

- La presente invención se refiere a células hospedadoras *E. coli* para su utilización en la expresión de proteínas recombinantes y más específicamente proporciona células hospedadoras *E. coli* mejores para la preparación de anticuerpos recombinantes.

La purificación a gran escala, económica de proteínas recombinantes es cada vez más un problema importante para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas recombinantes se preparan utilizando estirpes celulares ya sea de mamífero o bacterianas transgénicas para producir la proteína de interés por inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esta proteína. Las proteínas se segregan ya sea directamente desde la célula en el medio de cultivo circundante o se producen intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica lisis o alteración de la célula, que puede hacerse por varios métodos, como por ejemplo cizallamiento mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha alteración libera los contenidos de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que se eliminan generalmente por centrifugación diferencial o por filtración. El mismo problema surge, aunque a una escala más pequeña, con las proteínas directamente segregadas debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas intracelulares de las células hospedadoras en el transcurso de la ruta de producción de proteínas. Las proteínas recombinantes producidas de esta manera necesitaban ser purificadas lejos de las proteínas contaminantes de las células hospedadoras, ya que pueden ser tóxicas o inmunógenas. La alta pureza es esencial para las proteínas recombinantes requeridas para uso terapéutico, tales como los anticuerpos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos hasta hace poco se solían preparar en células de mamífero, pero se han utilizado también sistemas de producción alternativos tales como *E. coli*, levaduras *Pichia* y vegetales. Estas alternativas de preparación han sido guiadas por el producto del anticuerpo específico y el equilibrio entre escala, coste, velocidad, capital de riesgo y seguridad biológica (Humphreys y Glover, 2001, *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 4, 172-185). Además de los costes más obvios de la planta de fermentación, hora operador, ingredientes medios y tiempo requerido por el proceso/depreciación del capital, existen costes significativos relacionados con el 'tratamiento aguas abajo' es decir almacenamiento del producto en bruto, manipulación y purificación.

La purificación de anticuerpos a gran escala se basa principalmente en la precipitación fraccionada, el intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño y de interacción hidrófoba porque estos métodos son rentables y físicamente robustos. Si la purificación no puede conseguirse empleando estos métodos entonces será necesario considerable desarrollo para ampliar métodos analíticos más costosos tal como la cromatografía por afinidad. Este problema es probable que surja cuando las proteínas contaminantes del hospedador tengan propiedades físicas similares a las del anticuerpo recombinante, tal como pl, tamaño o hidrofobicidad. La eliminación de estos contaminantes puede requerir etapas de purificación de especialista que son muy indeseables cuando se realizan a gran escala. Por consiguiente hay necesidad de mejorar y simplificar los procesos de purificación a gran escala para anticuerpos preparados de manera recombinante cuando las proteínas contaminantes del hospedador son un problema específico.

O'Brien *et al. Protein Expression and Purification* 24, 43-50 (2002) describe la expresión bacteriana y la purificación de fragmentos Fab bovinos recombinantes.

El documento WO 98/18946 describe un procedimiento para la producción bacteriana de polipéptidos.

La patente EP 0 737 747 se refiere a la expresión citoplasmática en *E. coli* de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y fusiones de los mismos.

La presente invención resuelve el problema descrito anteriormente al proporcionar células hospedadoras *E. coli* mejoradas para la preparación de anticuerpos recombinantes caracterizadas por que dichas células han sido genéticamente modificadas con objeto de cambiar al menos una propiedad física de una proteína PstS de *E. coli* que en el tipo natural se purifica junto con dicho anticuerpo recombinante. Más específicamente, la presente invención proporciona células hospedadoras *E. coli* que expresan un anticuerpo recombinante caracterizado por que la célula hospedadora *E. coli* se ha genéticamente con objeto de cambiar el punto isoeléctrico de la proteína PstS de fijación al fosfato de *E. coli* y en donde el punto isoeléctrico ha sido alterado por:

la adición de una etiqueta de poliácido aspártico al terminal C de la proteína de fijación al fosfato y/o

el cambio de uno o más restos de aminoácido situados en la superficie de la proteína PstS de fijación al fosfato de *E. coli* por:

(a) substituyendo uno o más restos de lisina y/o arginina por ácido aspártico o ácido glutámico o

(b) substituyendo uno o más restos de ácido aspártico y/o ácido glutámico por lisina o arginina.

Así pues, los inventores han podido demostrar que el procedimiento de purificación para anticuerpos producidos en *E. coli* puede mejorarse alterando las propiedades físicas de las proteínas seleccionadas de *E. coli* de modo que ya no se purifican con el anticuerpo recombinante. Como resultado de utilizar las células hospedadoras *E. coli* de la presente invención es posible mejorar el procedimiento de purificación para anticuerpos producidos utilizando dichas células, por ejemplo el procedimiento puede ser más rápido y/o más económico que para los producidos en *E. coli* natural. Por consiguiente, las mejoras en la purificación de un anticuerpo en la presente invención puede considerarse que son cualquier alteración ventajosa para un procedimiento de purificación proveniente de las modificaciones en las propiedades físicas de las proteínas del hospedador *E. coli*. Puede incluir mejoras pero no se limitan a mejoras en la velocidad de purificación, reducción en costes de purificación o aumento en la calidad de los anticuerpos producidos. En una realización de la presente invención el procedimiento de purificación para un anticuerpo recombinante mejora por eliminación de una etapa de purificación dando como resultado ahorros tanto de coste como de tiempo. Preferiblemente la etapa que se elimina es una etapa de cromatografía por afinidad, una etapa de intercambio iónico, una etapa de exclusión por tamaño o una etapa de interacción hidrófoba. En una realización preferida la etapa que se elimina durante la purificación de un fragmento Fab' de anticuerpo es una etapa de interacción hidrófoba y la proteína de *E. coli* que se altera es la proteína de fijación al fosfato (PhoS/PstS). Preferiblemente la eliminación de dicha etapa conduce a ahorros de costes de aproximadamente 15% en comparación con el procedimiento de purificación original en base Fab' molar.

En otra realización de la presente invención, el procedimiento de purificación para anticuerpos recombinantes producidos en las células hospedadoras de la presente invención mejora al reducir la cantidad de matriz de la columna requerida, reduciendo por consiguiente los costes de material y la duración de los procesos. Preferiblemente esto se consigue reduciendo el número de proteínas contaminantes del hospedador que normalmente se purifican con el anticuerpo recombinante y reducen la capacidad de la columna para unirse al anticuerpo. En una realización preferida la capacidad de la columna que se aumenta es una columna de intercambio catiónico y las proteínas del hospedador *E. coli* que se alteran para evitar la fijación a esta columna son la proteína de fijación de dipéptido (DppA), la proteína de fijación de maltosa (MBP) y la Tiorredoxina.

Por lo tanto según la presente invención se proporcionan células hospedadoras de *E. coli* mejoradas para la preparación de anticuerpos recombinantes. Las células hospedadoras de *E. coli* de la presente invención pueden ser organismos naturales u organismos mutados capaces de producir anticuerpos recombinantes. Preferiblemente, sin embargo, el organismo hospedador es un organismo o la descendencia de un organismo que se ha transformado utilizando técnicas de ADN recombinante con una secuencia heteróloga de ADN que codifica la producción de un anticuerpo recombinante. Las cepas específicas del hospedador *E. coli* adecuadas para su utilización en la presente invención comprenden pero no se limitan a MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, XL1Blue. Un hospedador de *E. coli* preferido es *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) cepa hospedadora utilizada generalmente para fermentaciones de proteínas recombinantes. La expresión de cualquier gen extraño en *E. coli* se consigue por inserción de una copia de ADNc del gen en un vector de expresión. Se dispone de muchas formas de vector de expresión. Dichos vectores normalmente comprenden un plásmido origen de replicación de ADN, un marcador seleccionable de antibióticos y un iniciador y terminador de transcripción separado por una secuencia de multiclonación (casete de expresión) y una secuencia de ADN que codifica un punto de unión al ribosoma.

El término 'natural' se refiera a la célula hospedadora en la que una proteína hospedadora contaminante no se ha modificado. Es posible que otras proteínas en esta célula hospedadora se hayan modificado con fines fuera de esta invención.

Las proteínas hospedadoras de *E. coli* seleccionadas para modificación genética son proteínas que en el tipo natural son conocidas por purificarse junto con el anticuerpo recombinante durante la purificación. La expresión 'purificarse junto con' se refiera a la purificación de una proteína con otra bajo el mismo conjunto de condiciones de purificación. Normalmente ésta se refiere a la purificación de proteínas contaminantes de *E. coli* junto con un anticuerpo expresado de manera recombinante durante los procesos de purificación tal como la cromatografía.

La expresión 'modificación genética' se refiere a una o más supresiones, inserciones, sustituciones o mutaciones de una secuencia génica que producen un cambio en las propiedades físicas de la proteína codificada por este gen. Preferiblemente estos cambios no afectan la actividad fisiológica o biológica de la proteína codificada.

El término 'hidrofobicidad' se refiera a efecto neto de los aminoácidos hidrófobos e hidrófilos sobre toda la superficie de la proteína, o en parches localizados en superficie, en la solubilidad de la proteína en agua o disolventes orgánicos y su interacción con superficies sólidas y matrices.

El término 'pI o punto isoelectrico' se refiere al pH al que la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI puede calcularse a partir de la carga neta de los restos de aminoácidos del polipéptido o puede determinarse por electroforesis

La expresión 'propiedad física' se refiera a la naturaleza física de la propia proteína en lugar de su actividad fisiológica o biológica. Preferiblemente, propiedad física se refiera a características de la proteína tales como tamaño, hidrofobicidad y punto isoelectrico. Qué propiedad física de la proteína hospedadora de *E. coli* se altera vendrá impuesta por el procedimiento de purificación para el anticuerpo recombinante y las mejoras que se

requieren. Por ejemplo, el punto isoelectrico de una proteína puede alterarse para evitar fijarla a una columna de intercambio iónico específica en determinadas condiciones.

Las propiedades físicas de las proteínas contaminantes de *E. coli* que se alteran por modificación genética pueden incluir, pero no se limitan al, punto isoelectrico y/o al tamaño y/o a la hidrofobicidad. El tamaño de la proteína se refiere al peso molecular de la proteína. Pueden hacerse alteraciones de las propiedades físicas de las proteínas contaminantes utilizando cualquier combinación de adición, supresión, sustitución o inserción de secuencias específicas en la secuencia nucleotídica codificadora. En una realización las propiedades físicas de la proteína se alteran por la adición o supresión de al menos un aminoácido en el terminal N o C. En una realización una propiedad física de una proteína hospedadora contaminante se altera por adición de una etiqueta de aminoácido al terminal C.

- 5 Las propiedades físicas de las proteínas contaminantes de *E. coli* que se alteran por modificación genética pueden incluir, pero no se limitan al, punto isoelectrico y/o al tamaño y/o a la hidrofobicidad. El tamaño de la proteína se refiere al peso molecular de la proteína. Pueden hacerse alteraciones de las propiedades físicas de las proteínas contaminantes utilizando cualquier combinación de adición, supresión, sustitución o inserción de secuencias específicas en la secuencia nucleotídica codificadora. En una realización las propiedades físicas de la proteína se alteran por la adición o supresión de al menos un aminoácido en el terminal N o C. En una realización una propiedad física de una proteína hospedadora contaminante se altera por adición de una etiqueta de aminoácido al terminal C.
- 10 En una realización preferida la propiedad física que se altera es el punto isoelectrico y la etiqueta de aminoácido es una etiqueta de poliácido aspártico unida al terminal C. En una realización las proteínas de *E. coli* alteradas por adición de dicha etiqueta son la proteína de fijación de dipéptido (DppA), proteína de fijación de maltosa (MBP), Tiorredoxina y proteína de fijación al fosfato (PhoS/PstS). En una específica realización el pI de la proteína de fijación al fosfato de *E. coli* (PhoS/PstS) se reduce de 7,2 a 5,1 por adición de una etiqueta de poliácido aspártico
- 15 (poliD), que contiene 6 restos de ácido aspártico al terminal C.

También se prefiere la modificación de restos específicos de la proteína contaminante de *E. coli* para alterar sus propiedades físicas, ya sea solos o en combinación con la adición de etiquetas de terminal N o C. Dichos cambios pueden incluir inserciones o supresiones para alterar el tamaño de las sustituciones de proteínas o aminoácidos para alterar pI o la hidrofobicidad. En una realización estos restos están situados en la superficie de la proteína. En

- 20 una realización preferida, los restos en la superficie de la proteína PhoS están alterados para reducir el pI de la proteína. Preferiblemente se evitan los restos que han estado implicados por ser importantes en el enlace fosfato (Bass, patente de EE.UU. n° 5.304.472) para mantener una proteína PhoS funcional. Preferiblemente se dirigen a los restos de lisina que se proyectan lejos de la superficie de la proteína o están en grandes grupos de restos básicos o cerca. En una realización, la proteína PhoS tiene una etiqueta de poliácido hexaaspártico unida al terminal C mientras que se dirigen a los restos de la superficie en el extremo opuesto de la molécula para su sustitución. Preferiblemente los restos de lisina seleccionados se sustituyen por ácido glutámico o ácido aspártico para conferir un cambio potencial de pI mayor que cuando se cambian restos neutros por ácidos. 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
- 30 está haciendo la sustitución del aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se utiliza para sustituir el aminoácido natural. En las mutaciones preferidas de PhoS en la presente invención los restos de lisina (K) 275, 107, 109, 110, 262, 265, 266, 309, 313 están sustituidos por ácido glutámico (E), como mutaciones individuales o combinadas, además lisina(K)318 puede estar sustituido por ácido aspártico (D) como una mutación individual o combinada. Preferiblemente las mutaciones individuales son K262E, K265E y K266E. Preferiblemente las mutaciones combinadas son K265/266E y K110/265/266E. Más preferiblemente, todas las mutaciones se combinan con la etiqueta de poliácido aspártico (poliD) unida al terminal C y opcionalmente también con la sustitución K318D. En una realización preferida las mutaciones dan lugar a una reducción en pI de al menos 2 unidades. Preferiblemente las mutaciones de la presente invención reducen el pI de PhoS de 7,2 a entre aproximadamente 4 y
- 35 aproximadamente 5,5. En una realización de la presente invención el pI de la proteína PhoS de *E. coli* se reduce desde 7,2 hasta aproximadamente 4,9, aproximadamente 4,8 y aproximadamente 4,5 utilizando las mutaciones poliD K318D, poliD K265/266E y poliD K110/265/266E respectivamente.
- 40

Preferiblemente todas las modificaciones genéticas de las proteínas hospedadoras de *E. coli* dan lugar a proteínas que ya no se purifican junto con el anticuerpo recombinante durante la etapa de purificación deseada. Preferiblemente las alteraciones a la proteína PhoS dan lugar a una proteína que no se purifica en intercambio iónico

45 junto con el fragmento Fab' de anticuerpo y preferiblemente una etapa de interacción hidrofóbica previamente requerida ya no es necesaria. Preferiblemente todas las mutaciones a la proteína PhoS producen proteínas que ya no eluyen de una columna de intercambio catiónico a la misma concentración salina que el anticuerpo recombinante. Preferiblemente las proteínas PhoS mutantes eluirán a menos de 100 mM de NaCl, mientras que el anticuerpo eluye a 200 mM a pH 4,5. Más preferiblemente las proteínas PhoS mutantes no se fijarán de ninguna manera a una columna de intercambio catiónico a un pH de 5,0 o menos. En una realización de la presente invención las proteínas mutantes PhoS se fijarán a una columna de intercambio aniónico a pH8 o mayor donde la PhoS natural no.

50

Preferiblemente las alteraciones en las propiedades físicas de, proteínas hospedadoras contaminantes no afectan significativamente a la actividad o función biológica de la proteína. En una realización de la presente invención las proteínas PhoS mutantes continúan siendo funcionales como se determina por su capacidad para complementar una cepa ANCC75 de *E. coli* carente de PhoS (Amemura *et al.*, 1982, *Journal of Bacteriology*, 152, 692-701).

55 Preferiblemente todas las mutaciones en las proteínas hospedadoras de *E. coli* no afectan al crecimiento de *E. coli* o al rendimiento de anticuerpo recombinante en comparación con el tipo natural.

El anticuerpo recombinante producido en las células hospedadoras *E. coli* de la presente invención es cualquier molécula de inmunoglobulina incluida cualquier fragmento de inmunoglobulina de fijación al antígeno, tales como los

60 fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, y algunos de sus derivados, tales como los fragmentos monocatenarios Fv. La producción de anticuerpos es muy conocida en la técnica y fragmentos de anticuerpo se producen rutinariamente en *E. coli* por plegamiento a partir de los cuerpos de inclusión o por expresión funcional por secreción al periplasma

bacteriano (Plückthun y Pack 1997, *Immunotechnology*, 3,83-105; Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181).

El procedimiento de purificación para un anticuerpo dado es la secuencia de etapas de purificación requerida para generar anticuerpos recombinantes puros después de la expresión de dicho anticuerpo en *E. coli*. La purificación de anticuerpos recombinantes es muy conocida en la técnica y por cada anticuerpo puede diseñarse un procedimiento de purificación que genera el rendimiento y pureza máximos utilizando el número mínimo de etapas de purificación. Los anticuerpos recombinantes pueden purificarse utilizando una o más etapas de purificación, cuyos ejemplos comprenden la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba, de exclusión por tamaño, la electroforesis, HPLC en fase inversa, cromatoforografía, SDS-PAGE, precipitación con sulfato amónico y cromatografía por afinidad (p. ej. utilizando proteína A, proteína G o antígeno como reactivo de captura). Los métodos más frecuentes utilizados para producción a gran escala de anticuerpos recombinantes son la precipitación fraccionada, el intercambio iónico, la cromatografía por interacción hidrófoba y la cromatografía de exclusión por tamaño porque estos métodos son rentables y físicamente robustos. Estos métodos separan proteínas basándose en sus características físicas, punto isoeléctrico, hidrofobicidad y tamaño respectivamente. Si las proteínas contaminantes de *E. coli* tienen propiedades físicas similares al anticuerpo recombinante no puede ser posible separar las proteínas utilizando estos métodos. Para estos anticuerpos será necesario incluir más etapas adicionales de costosa purificación tal como cromatografía por afinidad de la proteína A y la proteína G.

A partir del examen del procedimiento de purificación de un anticuerpo recombinante dado el experto en la técnica puede determinar rápidamente si existen proteínas de *E. coli* contaminantes que purifican junto con el anticuerpo recombinante y son difíciles de eliminar. La persona que ha diseñado el procedimiento de purificación ya conocerá la existencia de dichas proteínas contaminantes, por ejemplo pueden ser etapas adicionales incorporadas en el procedimiento únicamente para su eliminación. Alternativamente, los geles de SDS-PAGE de fracciones de la columna pondrán de manifiesto qué proteínas sistemáticamente se purifican junto con el anticuerpo recombinante.

A partir del examen del procedimiento de purificación el experto en la técnica puede determinar qué propiedad o propiedades físicas de dicha(s) proteína(s) contaminante(s) sería deseable cambiar, de tal manera que la purificación del anticuerpo recombinante pueda mejorarse, por ejemplo, utilizando menos o diferentes etapas de purificación. Por ejemplo, puede ser apropiado reducir o aumentar el tamaño de la(s) proteína(s) contaminante(s) para permitir la separación del anticuerpo recombinante utilizando cromatografía de exclusión por tamaño en lugar de utilizar una etapa costosa de cromatografía por afinidad. Alternativamente puede ser apropiado alterar el punto isoeléctrico o la hidrofobicidad de la proteína contaminante para permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o de interacción hidrófoba. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente el cambio óptimo en la propiedad física para una proteína contaminante en un proceso de purificación dado. Puede ser también deseable cambiar las propiedades de más de una proteína *E. coli* y/o más de una física propiedad de dichas proteínas.

Habiendo seleccionado proteínas de *E. coli* que se purifican junto con el anticuerpo recombinante y determinado qué propiedades físicas de dichas proteínas sería deseable cambiar para mejorar el procedimiento de purificación, es necesario clonar el gen que codifica dichas proteínas de manera que puedan hacerse alteraciones en las propiedades físicas. Esto es rutinario para algún experto en la técnica y en primer lugar requiere que la secuencia proteica se obtenga de la proteína. Esto puede conseguirse por ejemplo, por secuenciación desde el terminal N de proteínas procedentes de transferencias western o secuenciación de triptico o fragmentos de CNBr generados a partir de dichas transferencias, todo lo cual son métodos de rutina para obtener la secuencia proteica. Dichas transferencias western pueden generarse a partir de geles de SDS-PAGE en los que en las fracciones de la columna que contienen la proteína hospedadora contaminante se ha realizado la electroforesis. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de dichas proteínas puede utilizarse a continuación para identificar por búsqueda de homología toda la secuencia proteica y del ADN a partir de bases de datos tales como SwissProt o Genbank dado que la secuencia genómica de *E. coli* está públicamente disponible (Blattner *et al.*, 1997, *Science*, 277 1453-1462). El gen que codifica la proteína contaminante puede clonarse a continuación utilizando técnicas muy conocidas tal como PCR que utiliza cebadores basados en la secuencia de ácido nucleico y utilizando ADN de *E. coli* como plantilla.

Una vez la proteína de *E. coli* contaminante se ha identificado y el gen que codifica dichas proteínas clonado, el gen puede modificarse entonces para generar los cambios físicos requeridos en la proteína que dé lugar a la purificación mejorada del anticuerpo recombinante. Los métodos para alterar las propiedades físicas de proteínas son muy conocidos en la técnica y pueden requerirse muchos cambios sistemáticos para conseguir el resultado deseado. A partir del análisis de la secuencia proteica, de las alineaciones de la secuencia y de la estructura cristalina, si están disponibles, es posible para el experto en la técnica identificar zonas de la proteína que pueden ser susceptibles de alteración. Las zonas seleccionadas dependerán de los cambios deseados en la propiedad física. Por ejemplo, para alterar el pI o la hidrofobicidad de la proteína it será necesario centrarse en los restos expuestos en superficie de una carga o hidrofobicidad concreta. Las alteraciones de tamaño pueden centrarse en dominios concretos que pueden eliminarse o modificarse. Los programas de ordenador tales como Rasmol o WebLab Viewer Lite son útiles para observar las estructuras cristalinas de las proteínas permitiendo selecciones acertadas y selecciones informadas de qué restos cambiar. Información adicional sobre restos importantes para la actividad o estructura de la proteína puede ser de dominio público.

Preferiblemente la proteína continuará siendo funcional y el examen de las alineaciones de la secuencia proteica y de las estructuras cristalinas si están disponibles, permitirían evitar regiones con zonas activas. Si la estructura cristalina no está disponible, la identificación de los restos que pueden alterarse sin destruir la función o expresión proteica puede probarse empleando métodos muy conocidos en la técnica tal como mutagenia de exploración de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science*, 244, 1081-1085).

Un método preferido de alteración de las propiedades físicas de proteínas es mediante la adición de etiquetas de proteínas, cuyos métodos son ampliamente conocidos en la técnica. Hasta la fecha éstos se han utilizado para alterar las propiedades de proteínas recombinantes para ayudar a su purificación en lugar de para alterar proteínas hospedadoras contaminantes. Cuando estas etiquetas se utilizan en la proteína recombinante necesitan ser eliminadas de la proteína purificada a fin de restablecer la función proteica, aumentar su solubilidad o con fines terapéuticos porque la etiqueta es antigénica. Esto puede presentar dificultades con frecuencia y puede ser el mayor impedimento para la aplicación satisfactoria de esta tecnología (Sassenfeld, 1990, *Tibtech*, 8, 88-93). En la presente invención la eliminación de dichas etiquetas no se necesita ya que la etiqueta se utiliza para cambiar el pI de las proteínas contaminantes de *E. coli* en lugar del propio anticuerpo recombinante. El pI, la hidrofobicidad y el tamaño de las proteínas pueden ser alterados por la adición de etiquetas de aminoácido, cuya naturaleza dependerá del resultado requerido. Por ejemplo, las etiquetas apropiadas para alterar el punto isoeléctrico de una proteína son etiquetas de poliarginina (Sassenfeld y Brewer, 1984, *Biotechnology*, 2, 76-81; Brewer patente de EE.UU. n° 4.532.207; Niederauer *et al.*, 1996, *Biotechnology Progress*, 10, 237-245; Stempfer *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology*, 14, 329-334), etiquetas de poliácido glutámico (Dalbøge *et al.*, 1987, *Bio/Technology*, 5, 1447-1457; Niederauer *et al.*, 1996) y etiquetas de dominio proteico a medida (Gräslund *et al.*, 2000, *Protein Engineering*, 13, 703-709 y Gräslund *et al.*, 2002, *Journal of Chromatography*, 942, 157-166). Las etiquetas que pueden utilizarse para alterar la hidrofobicidad comprenden etiquetas de polifenilalanina (Persson *et al.*, 1988, *Analytical Biochemistry*, 172, 330-337) y polipéptidos parecidos a la elastina (Meyer y Cholkoti, 1999, *Nature Biotechnology*, 17, 1112-1115). Existen además muchas proteínas y dominios de proteínas que se han utilizado como acompañantes viables de fusión que aumentan el tamaño de la proteína diana, incluida la fosfatasa alcalina (Carrier *et al.*, 1995, *Journal of Immunological Methods*, 181, 177-186), β -galactosidasa (Nielsen *et al.*, 1988, *JIMM* 111, 1-9), proteína de fijación de la maltosa (di Guan *et al.*, 1988, *Gene*, 67, 21-30), GST (glutatión S transferasa, Smith y Johnson 1988, *Gene*, 67, 31-40), dominio de fijación de la celulosa (Ong *et al.*, 1989, *Bio/Technology*, 7, 604-607), DsbA (Collins-Racie *et al.*, 1995, *Bio/Technology*, 13, 982-987), DsbC (Novagen), tiorredoxina y NusA (Novagen). Dichas fusiones pueden producir un aumento de tamaño de 10-60 kDa. Dichas etiquetas pueden utilizarse solas o en combinación con otras alteraciones específicas para la proteína contaminante descrita a continuación.

Otro método preferido de alteración de las propiedades físicas de proteínas hospedadoras es la modificación de restos específicos, cuyos métodos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las propiedades electrostáticas de una subtilisina se han modificado cambiando las cargas en superficie de la subtilisina mediante la introducción de múltiples restos de aminoácido cargados utilizando la estructura cristalina por rayos X como guía (Egmond *et al.*, 1996, en *Subtilisin Enzymes: Practical Protein Engineering*, R. Bott y C. Betzel eds., 219-228). Marttila *et al.*, 1998, *FEBS Letters*, 441, 313-317, han producido varios mutantes con carga de avidina con pI que oscilan entre 9,4 y 4,7, en comparación con el natural de pI de 10,5. Los mutantes se generaron sustituyendo restos básicos tales como lisina y arginina por aminoácidos neutros o ácidos basándose en datos cristalográficos conocidos junto con alineaciones de secuencias comparativas.

Seleccionar qué restos de la superficie para mutar pueden estimularse considerando la posición del resto con relación a la zona activa, al grado de exposición al disolvente, a la interacción potencial con otros restos de la superficie, a la potencial solvatación relativa de los grupos R de aminoácidos implicados, al pKa de los aminoácidos, a la hidrofobicidad/hidrofiliidad relativa de los aminoácidos implicados, a consideraciones estructurales y estéricas incluida la longitud relativa de los grupos R implicados.

Las mutaciones a restos específicos pueden conseguirse por métodos muy conocidos en la técnica tal como mutagenia mediada por oligonucleótidos (Zoller y Smith, 1982, *Nucleic Acid Research*, 10, 6487). Para hacer cambios en el punto isoeléctrico de una proteína es necesario mutar aminoácidos neutros a los de la carga deseada, o cambiar restos por unos con opuestas cargas (es decir lisina/arginina por ácido aspártico/glutámico. Por lo general para aumentar el pI de la proteína deben incorporarse aminoácidos más básicos tales como lisina y arginina en la proteína, reemplazando aminoácidos ácidos tales como ácido aspártico y ácido glutámico. Para disminuir el pI la elección de sustituciones debe invertirse.

Alternativamente puede ser deseable reducir la hidrofobicidad de la proteína contaminante y esto puede conseguirse sustituyendo restos hidrófobos tal como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, metionina y prolina con más restos hidrófilos o polares tales como serina, treonina, cisteína, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, histidina, lisina o arginina. Alternativamente para aumentar la hidrofobicidad deben invertirse las sustituciones de aminoácidos.

También es posible reducir el tamaño de la proteína contaminante identificando dominios o partes específicos de la proteína que pueden eliminarse sin afectar la expresión proteica y opcionalmente la función. Éstos pueden ser dominios en el terminal N o C o bucles expuestos que pueden eliminarse para formar fusiones en el marco. Alternativamente etiquetas de aminoácidos o dominios de proteína, tales como los descritos al principio pueden

fusionarse a la proteína con objeto de aumentar el tamaño de la proteína contaminante para mejorar la separación utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

Un experto en la materia apreciará que sea difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, supresión, inserción o etiqueta en la expresión, actividad o propiedades físicas de la proteína contaminante. El experto en la técnica ensayará una serie de diferentes alteraciones hasta conseguir el resultado requerido. Éstas pueden crearse y ensayarse sucesivamente o en paralelo. Un experto en la técnica apreciará que el efecto puede evaluarse por ensayos de identificación de rutina tales como los descritos a continuación seguidos de modificaciones adicionales si es necesario.

Con objeto de ensayar cada mutante la proteína alterada debe expresarse en una célula hospedadora *E. coli* que no expresa la proteína inalterada. Esto puede conseguirse utilizando un hospedador *E. coli* que no expresa el gen, tal como un mutante por supresión, o cultivando dicho hospedador en condiciones donde la expresión del gen está reprimida. La proteína contaminante alterada puede introducirse por medio de un plásmido, que producirá altos niveles de expresión de dicha proteína. Alternativamente, la proteína mutante puede ensayarse por integración directa del gen alterado en el genoma de *E. coli*, reemplazando por lo tanto el gen endógeno.

La expresión satisfactoria de cada proteína alterada puede confirmarse por análisis SDS-PAGE después de la fermentación de *E. coli*. Pueden haber casos donde la proteína alterada no se exprese propiamente y estas mutaciones deberían evitarse. Después de la expresión satisfactoria de la proteína mutada, las alteraciones en las propiedades físicas pueden evaluarse por cromatografía y electroforesis en gel. Por ejemplo si la alteración condujera a una disminución de tamaño éste puede probarse en una columna de exclusión por tamaño y en SDS-PAGE. Si la alteración condujera a un cambio en pI éste puede probarse utilizando cromatografía de intercambio iónico y electroforesis. Si la alteración condujera a un cambio en hidrofobicidad éste puede probarse utilizando cromatografía de interacción hidrófoba y solubilidad en disolventes. Para un experto en la técnica debe ser posible evaluar las proteínas alteradas por estos métodos en ausencia de la proteína recombinante. Opcionalmente, la separación del anticuerpo recombinante puede confirmarse fortaleciendo el extracto con anticuerpo recombinante purificado antes del ensayo.

Es preferible que la función biológica de la proteína modificada de *E. coli* se conserve mientras que las propiedades físicas de la proteína se alteren. La funcionalidad del mutante puede probarse de numerosas maneras ampliamente conocidas en la técnica dependiendo de la identidad de la proteína. Por ejemplo, la proteína mutante puede analizarse en un análisis biológico que demuestra su actividad biológica si ésta se conoce por ejemplo, un análisis enzimático. Alternativamente el gen que codifica la proteína mutante puede utilizarse para complementar un mutante de *E. coli* que carece del gen de interés seguido de análisis de la actividad biológica o de cultivo celular. Muchos de estos mutantes ya existen o pueden ser creados fácilmente por un experto en la técnica.

Utilizando los métodos descritos anteriormente será posible para un experto en la técnica identificar al menos un mutante que satisface los requisitos del procedimiento de purificación mejorado y preferiblemente sigue siendo funcional. Preferiblemente más de un mutante se seleccionará en esta etapa en caso de que alguno de los mutantes tenga un efecto perjudicial sobre el crecimiento de *E. coli* o el rendimiento del anticuerpo recombinante una vez integrado en el genoma. La integración del gen o genes mutados seleccionados en el genoma de *E. coli* de tal manera que el gen natural que está sustituido puede conseguirse utilizando métodos muy conocidos en la técnica (Hamilton *et al.*, 1989, *Journal of Bacteriology*, 171, 4617-4622). La secuencia alterada de ADN que es complementaria de una secuencia descubierta en el ADN genómico de *E. coli* está incluida en el vector para transformación. La transformación de *E. coli* con este vector da como resultado la recombinación homóloga con el genoma y la inserción del gen alterado en lugar del gen natural.

Después de la sustitución del gen o genes naturales por la secuencia génica modificada la célula hospedadora de *E. coli* mejorada se transforma con la secuencia génica recombinante del anticuerpo deseado como en el sistema de expresión de *E. coli* natural original. La célula hospedadora de *E. coli* se cultiva a continuación en las mismas condiciones que el tipo natural original y el cultivo celular y el rendimiento del anticuerpo recombinante se mide y se compara con el tipo natural. El rendimiento de anticuerpo recombinante puede analizarse utilizando métodos normalizados conocidos en la técnica para el anticuerpo recombinante utilizado. Por ejemplo, los fragmentos Fab de anticuerpo pueden cuantificarse por ELISA. Preferiblemente no debería observarse ningún efecto adverso sobre el rendimiento del anticuerpo o el crecimiento de *E. coli*. De observarse efectos adversos una de las se utilizaría otras mutaciones seleccionadas o se generarían nuevas mutaciones. Un experto en la técnica sabrá que estas mutaciones pueden ser analizadas sistemáticamente o en paralelo.

Para confirmar que la(s) proteína(s) alterada(s) del hospedador no se purifica(n) ya junto con el anticuerpo recombinante, el anticuerpo recombinante debe purificarse utilizando el procedimiento deseado y controlar la presencia de la(s) proteína(s) del hospedador alterada(s) por ejemplo, por SDS-PAGE. La(s) proteína(s) del hospedador alterada(s) debe comportarse como cabe esperar debido a los cambios en las propiedades físicas y ya no se purifican junto con el anticuerpo recombinante.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Croquis esquemático de clonación por PCR del gen *PhoS*

Figura 2. SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie de fijación de *PhoS* a la columna de intercambio aniónico, pH 8,0. Las bandas 1-4 son *PhoS* natural, las bandas 5-8 son *PhoS* poliD y las bandas 9-12 son *PhoS* K/D poliD. Las bandas 1, 5 y 9 son carga, las bandas 2, 6 y 10 son a contracorriente y las bandas 3, 4, 7, 8, 11 y 12 son fracciones iniciales y finales respectivamente de una etapa de etapa de elución con NaCl 1 M.

Figura 3. SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie de proteínas *PhoS* purificadas en un gradiente de NaCl en sefarosa SP pH 4,5. Banda 1 *PhoS* natural, banda 2 *PhoS* poliD, banda 3 *PhoS* K/D poliD, banda 4 *PhoS* K265/266E poliD, banda 5 *PhoS* K110E K318D poliD, banda 6 *PhoS* K110/265/266E poliD, banda 7 *PhoS* K110/265/266E K318D poliD, banda 8 *PhoS* K265/266E K318D poliD.

Figura 4. Gel IEF al 3-10% teñido con Coomassie de proteínas *PhoS* purificadas en un gradiente de NaCl en sefarosa SP pH 4,5. Banda 1 *PhoS* natural, banda 2 *PhoS* poliD, banda 3 *PhoS* K/D poliD, banda 4 *PhoS* K265/266E poliD, banda 5 *PhoS* K110E K318D poliD, banda 6 *PhoS* K110/265/266E poliD, banda 7 *PhoS* K110/265/266E K318D poliD y banda 8 *PhoS* K265/266E K318D poliD.

Figura 5. Complementación funcional inducción por carencia de *phoS* y PO_4 de actividad de fosfatasa alcalina en una *phoS* y cepa natural de *E. coli* por proteínas *PhoS* natural y mutante codificadas por plásmido.

Figura 6. Cultivo de DPH3 y producción de Fab' por fermentación de DPH3 *E. coli*.

Figura 7. SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie de fracciones de columna de intercambio catiónico procedente de la purificación de Fab' de W3110 y DPH3 en sefarosa SP a pH 5,0 y 3,0 mS/cm. Banda 1 DPH3 a contracorriente, banda 2 DPH3 eluida con NaCl 200 mM, banda 3 W3110 a contracorriente, banda 4 W3110 eluida con NaCl 200 mM, banda 5 *PhoS* natural, banda 6 *PhoS* poliD, banda 7 Fab'.

Figura 8. Fracciones de la columna de intercambio aniónico procedentes de Poros HQ a pH 8,0 de Fab' producido en DPH3 o W3110 procedente de fracciones de la columna de intercambio catiónico. SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie. Eluido de intercambio catiónico DPH3 aplicado a la columna de intercambio aniónico y recogido a contracorriente (banda 1) o eluido (banda 2). Eluido de intercambio catiónico DPH3 aplicado a la columna de intercambio aniónico y recogido a contracorriente (banda 3) o eluido (banda 4). Eluido de intercambio catiónico W3110 aplicado a la columna de intercambio aniónico y recogido a contracorriente (banda 5) o eluido (banda 6). Flujo a contracorriente de intercambio catiónico DPH3 aplicado a la columna de intercambio aniónico y recogido a contracorriente (banda 7) o eluido (banda 8). Banda 9 *PhoS* natural, banda 10 *PhoS* poliD y banda 11 Fab'.

Figura 9. Gel de SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie comparación el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab' B a pH 5,0. Banda 1 Carga de DPH1, banda 2 DPH1 FT, banda 3 eluido de DPH1, banda 4 carga de DPH2, banda 5 DPH2 FT, banda 6 eluido de DPH2, banda 7 carga de DPH3, banda 8 DPH3 FT, banda 9 eluido de DPH3, banda 10 carga de W3110, banda 11 W3110 FT, banda 12 eluido de W3110, banda 13 *PhoS* poliD, banda 14 Fab'.

Figura 10. Inmunotransferencias de anti-*PhoS* y anti-Fd de SDS-PAGE al 4-12% comparación el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab' B a pH 5,0.

Figura 11. Gel de SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie comparando el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab' B a pH 5,5.

Figura 12. Inmunotransferencias de anti-*PhoS* y anti-Fd de SDS-PAGE al 4-12% comparando el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab'-B a pH 5,5.

Figura 13. Gel de SDS-PAGE al 4-12% teñido con Coomassie comparando el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab'B a pH 6,0.

Figura 14. Inmunotransferencias de anti-*PhoS* y anti-Fd de SDS-PAGE al 4-12% comparando el rendimiento de *PhoS* mutante procedente de las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 durante la purificación por intercambio catiónico de Fab' B a pH 6,0.

Ejemplos

Pacientes y Métodos

Manipulaciones del ADN

Se utilizaron procedimientos normalizados manipulaciones para las generales del ADN. Las enzimas de restricción

- fueron de Boehringer Mannheim y la *Taq* polimerasa fue de Roche excepto para Precision Plus que fue de Stratagene. Los preparados de plásmido se llevaron a cabo utilizando kits de Qiagen como por las instrucciones de los fabricantes. Los oligonucleótidos fueron de Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, U.K. La secuencia del oligonucleótido y las zonas codificadas del producto de PCR se confirmaron por secuenciación de ambas cadenas
- 5 utilizando el kit de secuenciación de ciclo 'PRISM Big Dye' y un secuenciador ABI PRISM-3100 que utiliza el programa informático Genetic Analyzer. La cepa XL1Blue MRF⁺ Kan supercompetente de *E. coli* (Stratagene) se utilizó para todas las manipulaciones del ADN. La W3110 natural de *E. coli* (ATCC ref. 27325) se volvió competente para electroporación lavando y concentrando tres veces en glicerol al 10% (v/v) estéril enfriado con hielo para electroporación utilizando un Gene Pulser de BioRad con máquina de control de impulsos a 2.000 V, 25 mS y 200 Ω .
- 10 Se cultivó una colonia W3110 aislada reciente en 100 ml de medio 2xPY a 37°C hasta que la DO₆₀₀ alcanzó $\square$ 0,5 - 0,8. Posteriormente el cultivo se enfrió en hielo durante 15 minutos antes de sedimentar las células en tubos de centrifugadora enfriados con hielo a 4°C a 4.000 g durante 10 minutos. El sedimento celular se volvió a poner en suspensión, se lavó y se volvió a sedimentar 3 veces en glicerol al 10% (v/v) enfriado con hielo compuesto en agua desionizada estéril. Después de la etapa de sedimentación final el sedimento celular se volvió a poner en
- 15 suspensión en un volumen final de 10 ml de glicerol al 10% (v/v) enfriado con hielo compuesto en agua desionizada estéril. Las células se utilizaron inmediatamente o se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70°C.

Complejo bacteriano y medio exento de fosfato.

- Se utilizó 'medio PhoS' para todo el cultivo general de *E. coli*, preparados de plásmido y experimentos de expresión de PhoS con objeto de proporcionar un PO₄ y medio rico en péptidos para reprimir el regulón *pho* ('medio PhoS' =
- 20 triptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), KH₂PO₄ al 0,3% (p/v), K₂HPO₄ al 0,7% (p/v), NaCl al 0,5% (p/v) y casaminoácidos al 0,5% (p/v) de DIFCO). El medio definido como 'exento de PO₄' era el medio MOPS descrito por Neidhardt *et al.*, 1974 *Journal of Bacteriology*, 119, 736-747 enriquecido con glucosa al 0,5% (p/v), casaminoácidos al 0,5% (p/v) y tiamina 1 mM. Se cultivaron células destinadas a episodios de integración utilizando 2 x PY (agar-agar al 2% (p/v), fitona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), NaCl al 0,5% (p/v) y se
- 25 prepararon a pH 7,0 con NaOH 1 M). Los medios se enriquecieron con agar-agar al 3% (p/v), carbenicilina a 200 μ g/ml o cloranfenicol a 20 μ g/ml IPTG a 200 μ M y XP a 40 μ g/ml según convenga.

Montaje de Fab' por ELISA.

- Se recubrieron placas ELISA durante la noche a 4°C con HP6045 a 2 μ gml⁻¹ en PBS (HP6045, anti-IgG humana Pan Fd (CH₁) monoclonal IgG2a de ratón, se obtuvo a partir del hibridoma HP6045 en ATCC. Se recubrió
- 30 inmunoglobulina procedente del sobrenadante del cultivo por purificación de la proteína A, y se eliminaron restos de IgG bovina en una columna con anti-IgG bovina en oveja). Después de lavar 4 veces con dH₂O, se llevaron a cabo diluciones 1/2 en serie de muestras y patrones en la placa en 100 μ l de muestra/tampón de conjugado (Tris/Cl 100mm pH 7, NaCl 100 mM, caseína al 0,2% (p/v), Tween 20 al 0,0002% (v/v)), y la placa se agitó a 250 r.p.m., temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 4 veces con dH₂O, se añadió 100 μ l del anticuerpo GD12 revelador, HRP
- 35 conjugó cadenas kappa anti humanas de F(ab')₂ (The Binding Site, Birmingham, U.K.), se diluyó 1/1000 en muestra/tampón de conjugado y la placa se agitó a 200 r.p.m., a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 4 veces con dH₂O, se añadió 100 μ l de sustrato de 3-3'-5-5' tetrametilbenzidina (TMB) (acetato/citrato sódico 0,1 M pH 6, 100 μ g/ml de TMB, H₂O₂ al 0,01% (v/v)) y se registraron las A₆₃₀ utilizando un lector de placa automatizado. La concentración de Fab' en los extractos periplásmicos se calculó por comparación con los patrones
- 40 purificados de Fab' del isotipo apropiado.

Clonación del gen PhoS.

- El gen PhoS natural junto con $\square$ 700 pb de la secuencia cromosómica en 3' se clonó por PCR utilizando W3110 *E. coli* como plantilla como fragmento de restricción *Dra* I-BstB I en pSK-(Stratagene). Con objeto de facilitar el hacer cambios en el terminal C de PhoS se hicieron cambios de tres pares de bases solo 3' al codón de terminación del
- 45 gen PhoS para incorporar una nueva secuencia *Hind* III (véase la figura 1 para croquis esquemático). Después de hacer cambios en el gen PhoS y probar en estos cambios el rendimiento cromatográfico de la proteína PhoS, los montajes génicos finales se transportaron como fragmentos *Sma* I-BamH I en pKO3 para recombinación en el cromosoma de *E. coli*. La secuencia para el gen PhoS y su secuencia genómica circundante se encontraron en la bibliografía y bases de datos públicas (Surin *et al.*, 1984 y Blattner *et al.*, 1997).

- 50 Construcción de genes que codifican proteínas PhoS mutantes

- Utilizando W3110 como plantilla la secuencia codificadora de PhoS junto con alguna secuencia genómica en 3' se clonó en dos partes por PCR utilizando *Taq* polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados para esto se muestran en la Tabla 1. Se cambiaron tres pares de bases inmediatamente después del codón de terminación utilizando mutagenia por PCR para codificar una secuencia de *Hind* III. Por consiguiente la zona codificadora de PhoS, incluidos algunos
- 55 cambios en el extremo 3' del gen podría clonarse como fragmentos de restricción *Dra* I-*Hind* III en el plásmido pSK restringido por *Sma* I-*Hind* III. Los cambios hechos en el extremo 3' del gen PhoS comprenden zonas codificadoras que codifican ácidos poli(hexa) aspártico y ácidos poli(hexa) aspárticos con un cambio de K318D.

Se llevaron a cabo mutaciones en restos de la superficie utilizando PCR mutagénica dirigida a oligonucleótidos que

utiliza oligos (mostrado en la Tabla 1) que abarcaba secuencias de restricción útiles como se muestra en la figura 1. Por consiguiente mediante la utilización de PCR y clonación con restricción es posible construir y mezclar estas mutaciones.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para construcción, mutagenia, secuenciación e identificación de genes PhoS.

Tipo de oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos	Seq. id. n°:
A) PhoS clonación de oligonucleótidos	<i>Dra</i> I (directa) GTAATTGACTGAATATCAACG	1
	<i>Hind</i> III (directa) CTGTACTAATAAGCTTCCAGGCCGGGTACGGTGTTTTACGC C	2
	<i>Hind</i> III (inversa) CGGCCTGGAAGCTTATTAGTACAGCGGCTTACCGCTACTGT C	3
	<i>Bst</i> BI (inversa) CCGACTCTTTCATCATCACCGGGG	4
	Poli D (inversa) CGGCCTGGAAGCTTATTAATCGTCATCGTCATCGTCGTACA GCGGCTTACCGCTACTGTC	5
	K/D + Poli D (inversa) CGGCCTGGAAGCTTATTAATCGTCATCGTCATCGTCGTACA GCGGGTCCCCGCTACTGTCTTTAATATTGGTC	6
	Null PhoS (directa) CGCCGCGACCTTATCGATGAGTGCTTAATAAGTGATTGAAG AAGCAAGCCTGACAGGTGCAGG	7
	Seq 1 (directa) GCGTTCGTTTCAGCGTCTGCCGGG	8
	Seq 2 (inversa) CTGCTTCGCGTAAGCATATTC	9
	Seq 3 (directa) CCAATATTAAAGACAGTAGCGG	10
B) Secuenciación de oligonucleótidos	Seq 4 (inversa) CATTTTGTAATGCCGGATGCGGCG	11
	Seq 5 (directa) CTGAGCTTGCGCCTGGCTGGC	12
	Seq 6 (inversa) GCTGCCAGCAGCTCAATGGCG	13
	PoliD screen (directa) TACGACGATGACGATGACGATTAA	14

Tipo de oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos	Seq. id. nº:
	PhoS stop screen (directa) GCTTAATAAGTGATTGAAGAA	15
D) Mutagenia de la superficie de oligonucleótidos	PhoS <i>BspE</i> I K107E (directa) CTGAAGTCCGGAGAACTGGTGCTGGATGGTAAAACCCCTCGGCGAC ATCTACCTGGGCGAAATCAAGAAGTGGGATGATGAAGCCATCGCC	16
	PhoS <i>BspE</i> I K107/109/110E (directa) CTGAAGTCCGGAGAACTGGTGCTGGATGGTAAAACCCCTCGGCGAC ATCTACCTGGGCGAAATCGAAGAATGGGATGATGAAGCCATCGCC	17
	PhoS <i>BspE</i> I K109E (directa) CTGAAGTCCGGAGAACTGGTGCTGGATGGTAAAACCCCTCGGCGAC ATCTACCTGGGCAAAATCGAAAAGTGGGATGATGAAGCCATCGCC	18
	PhoS <i>BspE</i> I K109/110E (directa) CTGAAGTCCGGAGAACTGGTGCTGGATGGTAAAACCCCTCGGCGAC ATCTACCTGGGCAAAATCGAAGAATGGGATGATGAAGCCATCGCC	19
	(PhoS <i>BspE</i> I K110E(directa) CTGAAGTCCGGAGAACTGGTGCTGGATGGTAAAACCCCTCGGCGAC ATCTACCTGGGCAAAATCAAGGAATGGGATGATGAAGCCATCGCC	20
	PhoS <i>EcoR</i> I K275E (directa) GTGCTGGAATTCTTCGACTGGGCGTACAAAACC	21
	PhoS <i>Nsi</i> I K262/265/266E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACG AAGATCAGGAAGAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	22
	PhoS <i>Nsi</i> I K262/265E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACG AAGATCAGGAAAAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	23
	PhoS <i>Nsi</i> I K262/266E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACG AAGATCAGAAGGAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	24
	PhoS <i>Nsi</i> I K262E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACG AAGATCAGAAGAAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	25
	PhoS <i>Nsi</i> I K265/266E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACA AAGATCAGGAAGAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	26
	PhoS <i>Nsi</i> I K265E (directa) GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTATTCTGATCCACA AAGATCAGGAAAAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	27
	PhoS <i>Nsi</i> I K266E (directa)	

Tipo de oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos	Seq. id. n°:
	GAAGATGCATGGCCTATTACCTCTACCACGTTTCATTCTGATCCACA AAGATCAGAAGGAACCAGAACAAGGCACAGAAGTGCTG	28
	PhoS <i>BspE</i> I (inversa)	
	CAGTTCTCCGGACTTCAGCCCTGGAATGTTAACCGC	29
	PhoS <i>EcoR</i> I K275E (reverse)	
	GTCGAAGAATTCCAGCACTTCTGTGCCTTGTCTGG	30
	PhoS <i>Hind</i> III K309/313/318E (inversa)	
	CGATAAGCTTATTAATCGTCATCGTCATCGTCGACAGCGGTTTAC CGCTACTGTCTTCAATATTGGTTTCCCACGCAGCGGAACCTGTT AAC	31

Construcción de plásmidos de recombinación integrantes del mutante PhoS.

La eficiencia de la recombinación homóloga dirigida de genes mutados en el cromosoma de *E. coli* aumenta si existen zonas contiguas de 100% de identidad de secuencia en ambas caras de la secuencia insertada. La longitud de estas zonas contiguas normalmente es del orden de 200-1000 pb (Hamilton *et al.*, 1989, *Journal of Bacteriology*, 171, 4617-4622). Aproximadamente 700 pb de secuencia cromosómica en 3' para los cambios mutagénicos se clonó por PCR en virtud de una secuencia introducida de *Hind* III y una secuencia de *BstB* I innata. Este fragmento *Hind* III-*BstB* I se clonó en el pSK restringido por *Hind* III-*Cla* I.

Después de la construcción y pruebas de todos los mutantes de PhoS expresados en pSK-, todos los genes PhoS finales de interés tenían la zona cromosómica contigua a 3' descrita anteriormente clonada detrás mediante desplazamiento del fragmento *Hind* III-*Xho* I de 676 pb de la zona cromosómica contigua a 3' en los plásmidos de expresión de PhoS asimismo restringidos. El casete de integración de PhoS se desplazó como un fragmento de restricción *Bam*H I-*Sal* I de 1852 pb asimismo en el plásmido pKO3 de recombinación/sustitución homóloga restringido (Link *et al.*, 1997, *Journal of Bacteriology*, 179, 6228-6237).

Construcción de sustituciones cromosómicas del gen PhoS en W3110.

Se utilizó el plásmido pKO3 (Link *et al.*, 1997) para generar sustituciones génicas de cromosomas sin marcadores. El plásmido utiliza el mutante sensible a la temperatura del pSC101 origen de replicación junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar episodios de integración cromosómica. 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 del 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).

Utilización del plásmido de integración pKO3

Día 1 Se mezclaron 100 µl de células de *E. coli* con 3 µl de ADN pKO3 en una cubeta de electroporación de BioRad refrigerada antes de la electroporación a 2.500 V, 25 µF y 200 Ω. Se añadieron inmediatamente 900 µl 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 µl sobre placas con 2xPY agar-agar que contenían cloranfenicol a 20 µg/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 que 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 100 µl 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 20 µg/ml de cloranfenicol o sacarosa al 5% (p/v). 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 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 sacarosa al 5% (p/v) y las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

- 5 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 actuaron 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 Precision plus polimerasa.

Ensayos de complementación de PhoS.

- 10 Las cepas de *PhoS* tal como ANCC75 (Amemura *et al.*, 1982, *Journal of Bacteriology*, 152, 692-701) expresan constitutivamente la fosfatasa alcalina (FA) debido a una desconexión en sus capacidades de detección y antioxidante de PO₄. Es posible complementar la lesión de *phoS* con un gen *PhoS* expresado en el plásmido y la complementación puede detectarse utilizando sustratos cromógenos para la fosfatasa alcalina tales como 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (XP), o para-nitrofenil-fosfato (pNPP), ensayar la actividad de FA en placas de agar-agar o en medio líquido respectivamente. Para placas con agar-agar se incluía 40 µg/ml de XP junto con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 200 µM y antibiótico y a continuación las colonias se cultivaron durante la noche a 37°C.
- 15 Para el ensayo de FA en medio líquido se prepararon muestras de 10-100 µl de cultivo inducido con una DO₆₀₀ de □ 1,0 hasta 1 ml con Tris.Cl 1,5 M pH 8,0 que contenían 25 µl de SDS al 0,1% (p/v) y 50 µl de cloroformo, mezclado por agitación intensa durante 5 s y preincubado a 30°C durante 5 minutos. El ensayo se inició añadiendo y
- 20 mezclando por inversión 200 µl de pNPP 15 mM e interrumpiendo después de 10 minutos por adición y mezclado por inversión 200 µl de KH₂PO₄ 1 M. El ensayo se llevó a cabo a 30°C. Después de la sedimentación de las células en una microcentrifugadora se midió la absorbancia del sobrenadante a 420 nm con relación a un blanco. Una unidad actividad de de fosfatasa alcalina se definió como ΔA₄₂₀DO₆₀₀⁻¹min⁻¹.

Cálculos del P.M. y pl teóricos.

- 25 Los cálculos de los parámetros teóricos se hicieron todos con el programa informático MacVector.

Espectrometría de masas

La masa molecular de Fab" se determinó utilizando el espectrómetro de triple cuadrupolo Micromass Ultima en modo de ionización por electroatomización de iones positivos. Se desalaron muestras de Fab" para eliminar Tris mediante múltiples intercambios de volumen con acetato amónico 10 mM empleando concentradores Microcon con un tamaño

- 30 límite de membrana de 10 kDa (Amicon, G.B.).

Cromatografía de intercambio catiónico

Los sedimentos celulares del matraz en el agitador y de fermentación se volvieron a poner en suspensión en Tris.Cl 100 mM/EDTA 10 mM pH 7,4 a 30 DO₆₀₀/ml de volumen de cultivo original respectivamente y se agitaron durante la noche a 30 o 60°C. Después de la centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos para eliminar los desechos celulares

- 35 se ajustó el sobrenadante con ácido acético 1 M para llevar su pH por debajo del del tampón en el experimento de purificación (normalmente pH 4,5, 5,0 o 6,0) y a continuación se diluyó con dH₂O hasta que la conductividad fue ≤3,5 mS_{cm}⁻¹. Después de la recomprobación del pH, el extracto periplásmico se clarificó por centrifugación a 20.000 g durante 10 minutos seguido de filtración a través de una membrana de 0,2 µm.
- 40 Una columna con 5 ml de sefarsa SP (Pharmacia) introducida en tampones de acetato sódico (NaAc) se utilizó de principio a fin a un caudal de 1 ml/min utilizando un P500 FPLC de Pharmacia con el programa informático director FPLC y una probeta de carga de muestras de 10 ml. Para todos los montajes de PhoS y Fab" se utilizó el régimen de elución básica siguiente: el equilibrado de la columna se completó con 1 ml de tampón de equilibrado, 9 ml de muestra se cargaron y a continuación se eluyó con a 70ml (~14 volúmenes de columna) gradiente de NaCl de 0-200 mM en NaAc, la columna se lavó con 7 ml de NaCl 1 M en NaAc y a continuación se reequilibró con 13 ml de
- 45 tampón de carga (NaAc). Se anotó el tiempo y la conductividad del punto de elución controlado por A₂₈₀ y se recogieron manualmente fracciones.

Cromatografía de intercambio aniónico

Una columna Poros HQ de 2,5 ml (PerSeptive Biosystems) introducida en Tris.Cl 20 mM pH 8,0 se utilizó de principio a fin. Muestras procedentes del intercambio catiónico se intercambiaron por tampón Tris.Cl en 20 mM pH 8,0 antes de su uso. El equilibrado de la columna se completó con un lavado con 1 ml, se cargaron 9 ml de muestra, seguido de una etapa de lavado de 10,9 ml y a continuación se eluyó con 3,9ml de NaCl 1 M en Tris.Cl 20 mM pH 8,0 y a continuación se reequilibró con 10 ml de tampón de carga (Tris.Cl 20 mM pH 8,0). Se controlaron las fracciones proteicas por A₂₈₀ y as fracciones se recogieron manualmente.

- 50

Geles de SDS-PAGE, inmunotransferencia e IEF

Los geles de SDS-PAGE eran geles NuPAGE al 4-12% de Invitrogen introducidos en tampón MES utilizando patrones SeeBlue2. Estaban ya sea teñidos con Coomassie o las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF utilizando $\frac{1}{2} \times$ tampón Towbin. Los geles de IEF eran geles de placa vertical de IEF pH 3-10 de Invitrogen que utilizan patrones Serva pl 3-10, teñidos con Coomassie. Después de destañar los gels se exploraron y/o se secaron entre membranas de celulosa.

Ejemplo 1

Examen del procedimiento de purificación de un fragmento de anticuerpo Fab' para identificar mejoras que podrían hacerse alterando proteínas hospedadoras.

- 10 Los fragmentos Fab' expresados en *E. coli* se purificaron rutinariamente en extractos periplásmicos utilizando tres etapas cromatográficas. La primera etapa fue intercambio catiónico a pH 4,5 durante la cual el fragmento de anticuerpo Fab' se fija a la columna de intercambio catiónico. El fragmento Fab' se eluyó del intercambio catiónico y a continuación se introdujo en el intercambio aniónico a pH 8. El fragmento Fab' no se fija en el intercambio aniónico a este pH e se recogió en el flujo a contracorriente. Durante esta etapa la mayoría de las proteínas de *E. coli* que permanecen y la endotoxina se fijaron a la columna de intercambio aniónico y se eliminaron del preparado de Fab'.
- 15 Una etapa final, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se necesitó para eliminar una única proteína abundante de *E. coli* que se purificó por ambas etapas de intercambio iónico, como se determina por SDS-PAGE.

- Era evidente a partir del examen de este procedimiento de purificación que sería deseable eliminar esta etapa final de HIC ya que esto aceleraría el proceso de purificación y daría lugar a considerables ahorros de coste tanto en materiales como en trabajo. El ahorro de coste estimado para eliminar esta única etapa era del 15% sobre una base de Fab' molar. Para conseguir esto sería necesario alterar las propiedades físicas de la proteína contaminante de *E. coli* de tal manera que ya no se purificaba junto con el Fab' en intercambio iónico y por consiguiente la etapa de HIC ya no sería necesaria. Esto podría conseguirse alterando el pI de la proteína de tal manera que ya no se fija tampoco a la columna de intercambio catiónico o eluye de esta columna a una concentración salina diferente de la del Fab'.
- 20 Esta proteína contaminante se identificó después como proteína de fijación al fosfato (PhoS/PstS) (Ejemplo 2).

- Otra mejora potencial se identificó tras el examen de un gel para SDS-PAGE de todas las proteínas que se fijan a la columna de intercambio catiónico. Esto puso de manifiesto que existían varias otras proteínas hospedadoras abundantes que se habían fijado a la columna. La eliminación de estas proteínas aumentaría considerablemente la capacidad de la columna para fijar Fab' y por consiguiente conduciría a ahorros de costes debido a tamaños de columna reducidos y a la velocidad de purificación. Para conseguir esto sería necesario alterar el pI de las proteínas contaminantes de tal manera que ya no se fijen a la columna de intercambio catiónico. Estas proteínas contaminantes fueron identificadas después como proteína de fijación de dipéptido (DppA), proteína de fijación de maltosa (MBP), Tiorredoxina y una hipotética proteína de 24 kDa (Ejemplo 2).
- 30

Ejemplo 2

- 35 Identificación de las proteínas contaminantes seleccionadas en el ejemplo 1

Una fracción periplásmica producida a partir de una fermentación normal de W3110 de *E. coli* se extrajo durante la noche a 30°C en Tris.Cl 100 mM EDTA 10mM pH 8,0. Después de la centrifugación el sobrenadante se diluyó con H₂O y ácido acético hasta que su pH fue $\leq 4,5$ y su conductividad fue $\leq 3,5 \text{ mS cm}^{-1}$. Ésta se cargó en una columna de intercambio catiónico de manera normal. Después del lavado se eluyeron las proteínas fijadas. El Fab' y sus fragmentos se eliminaron pasando el eluido por una columna con proteína G dos veces y proteína L una vez y a continuación el eludo exento de Fab' se concentró con una célula agitada en Amicon con membrana de 10 kDa de umbral. Se demostró que todos estos péptidos relacionados con Fab' habían sido eliminados eficazmente con inmunotransferencia anti-kappa y anti-CH1, ELISA sándwich y HPLC. La muestra concentrada se analizó utilizando geles de SDS-PAGE al 4-12% teñidos con Coomassie. Se transfirieron geles idénticos a la membrana de PVDF, se tiñeron con PonceauS para mostrar la posición de las bandas que se escindieron con un bisturí limpio. Las proteínas se sometieron a secuenciación en el terminal N y los resultados se utilizaron para cuestionar a SwissProt. Los resultados se muestran a continuación.

40

45

Muestra de proteína	Proteína identificada	SwissProt
Banda 1	Proteína de fijación de dipéptido, DppA	P23847
Banda 2	Proteína de fijación de dipéptido, DppA	P23847
Banda 3	Proteína de fijación de maltosa, MBP	P02928

Muestra de proteína	Proteína identificada	SwissProt
Banda 4	Proteína de fijación de fosfato, PhoS / PstS	P06128
Banda 5	Proteína hipotética de 24 kDa	P45390
	2ª secuencia de proteína de fijación de molibdato	P37329
Banda 6	Tiorredoxina	P00274
	2ª secuencia de proteína hipotética de 12,5 kDa	P76258

Ejemplo 3

Creación y experimentación de proteínas PhoS con colas poliiónicas en el terminal C

Efecto de las colas poliiónicas en el terminal C sobre la purificación por intercambio catiónico a pH 4,5

- 5 Inicialmente se clonaron 3 versiones de PhoS y se ensayó la expresión en *E. coli* y la purificación por intercambio catiónico: PhoS natural (wtPhoS), una PhoS con 6 ácidos aspárticos en el terminal C (PhoS poliD), y una PhoS con 6 ácidos aspárticos en el terminal C junto con una mutación adyacente a K318D (PhoS K/D poliD). Las tres se expresaron bien en matraces de agitación según se estima por tinción con Coomassie de SDS-PAGE de los extractos periplásmicos en bruto con pH ajustado. El resumen de detalles tales como plásmido, denominación de
- 10 proteínas, peso molecular, pI estimado, pI medido y curva de elución con NaCl a pH 4,5 procedente de la columna de intercambio catiónico se muestran en la Tabla 2.

La adición de la cola poliD motivó que la proteína PhoS eluya ~20% antes en un gradiente salino con relación a la proteína natural, en NaCl 103 mM. Sin embargo el efecto deseado de la proteína de no fijarse en absoluto a la columna de sefarosa SP a pH 4,5 no se había conseguido. Habían algunas pruebas de que la mutación adicional de

15 la superficie de K318D (que está muy cerca de la terminal C) tenía una ventaja adicional sobre el rendimiento del intercambio catiónico por encima del de la etiqueta poliD sola.

Efecto de una cola poliD del terminal C sobre la purificación por intercambio aniónico a pH 8,0.

- Se simulon extractos periplásmicos por mezcla de muestras a contracorriente y elución procedentes de experimentos de intercambio catiónico y tampón intercambiado a Tris.Cl 20 mM pH 8,0. Muestras de PhoS natural, PhoS poliD y PhoS K/D poliD se introdujeron en una columna pequeña de intercambio aniónico Poros HQ. Los
- 20 resultados mostrados en la figura 2 demuestran que aunque la proteína natural PhoS no se fija a la columna a este pH tanto las versiones poliD como K318D poliD de PhoS se fijan. Por consiguiente en estas condiciones es probable que además de los cambios de pI que han ocurrido debido a la presencia de la etiqueta poliD, la propia etiqueta puede ser que actúe como una 'cola por afinidad' en estas condiciones.

Tabla 2. Detalles de todas las proteínas PhoS y sus plásmidos

Proteína PhoS	Plásmido	Mutaciones en proteínas	P.M. (Da) teórico	P.M. (Da) medido	pl calculado	pl IEF	Elución calculada de NaCl de sefarosa SP pH 4,5
PhoS natural	pDPH186	Ninguna	34418,80	34422,4 ± 0,0	6,97	~7,20	103 mM
PhoS poliD	pDPH187	Cola hexa-Asp en terminal C	35109,27	35112,4 ± 0,3	4,89	-5,10	83 mM
PhoS K/D poli D	pDPH188	Cola Hexa-Asp y K318D	35096,21	35101,5 ± 0,3	4,72	~4,90	77 mM
PhoS K107/109/110E	pDPH191	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie triples de K107/109/110 E	35112,21	ND	4,52	ND	No mensurable (sin expresión/ recuperación tras del pH)
PhoS K275E	pDPH192	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K275E	35110,24	ND	4,73	ND	100 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K262/265/266E	pDPH193	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K262/265/266 E	35112,20	ND	4,52	ND	33 mM (expresión / recuperación reducida tras pH)
PhoS K309/313/318E	pDPH194	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K309/313/318 E	35114,16	ND	4,36	ND	73 mM
PhoS K262/265/266/ 275E	pDPH195	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K262/265/266 E y K275E	35119,06	ND	4,07	ND	55 mM (poca expresión/ recuperación tras pH)
PhoS K262/265/266E, K318D	pDPH196	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K262/265/266 E y K318D	35099,15	ND	4,42	ND	46 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K107E	pDPH198	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K107E	35110,25	ND	4,73	ND	70 mM (poca expresión/ recuperación tras pH)
PhoS K109E	pDPH199	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K275E	35110,25	ND	4,73	ND	52 mM
PhoS K110E	pDPH200	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K110E	35110,25	ND	4,73	ND	55 mM
PhoS K109/110E	pDPH201	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K109/110E	35111,23	ND	4,61	ND	No mensurable (sin expresión/ recuperación tras pH)
PhoS K262E	pDPH202	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K262E	35110,25	ND	4,73	ND	68 mM
PhoS K265E	pDPH203	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K265E	35110,25	ND	4,73	ND	60 mM
PhoS K266E	pDPH204	Cola hexa-Asp en terminal C y mutación en superficie de K266E	35110,25	ND	4,73	ND	58mM

Proteína PhoS	Plásmido	Mutaciones en proteínas	P.M. (Da) teórico	P.M. (Da) medido	pl calculado	pl IEF	Elución calculada de NaCl de sefarosa SP pH 4,5
PhoS K262/265E	pDPH205	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K262/265E	35111,22	ND	4,61	ND	57 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K262/266E	pDPH206	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K262/266E	35111,22	ND	4,61	ND	57 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K265/266E	pDPH207	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K265/266E	35111,22	35113 ± 0,3	4,61	~4,80	38 mM
PhoS K110E K318D	pDPH208	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K110E y K318D	35097,20	35099,8 ± 0,5	4,61	~4,80	68 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K110/265/2 66E	pDPH209	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K110/265/266E	3511220	35113 ± 0,5	4,52	-4,60	29 mM
PhoS K110/265/2 66E K318D	pDPH210	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K110/265/266E y K318D	35099,20	35099,5 ± 0,3	4,43	~4,50	33 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)
PhoS K265/266E K318D	pDPH211	Cola hexa-Asp en terminal C y mutaciones en superficie de K265/266E y K318D	35098,17	35100,5 ± 0,2	4,52	~4,60	52 mM (expresión/ recuperación reducida tras pH)

Ejemplo 4

Efecto de mutaciones en superficie y de una cola poliD en el terminal C sobre la purificación por intercambio catiónico de PhoS a pH 4,5.

- 5 Se analizó la estructura cristalina de PhoS con PO₄ fijado a la zona activa (Luecke y Quioco, 1990, *Nature*, 347, 402-406) para hallar restos en superficie que estuvieran disponibles para mutaciones. Restos de lisina (P.M. 128,17 Da, pKa = 10,79) se cambiaron a restos de ácido glutámico (P.M. 129,12, pKa = 4,07) con objeto de reducir el pl de PhoS. El cambio de restos básicos por ácidos confiere un mayor cambio de pl potencial por mutación (un cambio de pl de -0,15 en PhoS) que al cambiar restos neutros a ácidos (-0,07). Además, como los restos de ácido glutámico
- 10 expuestos en superficie es probable que estén muy solvatados (como los restos de lisina) puede haber menos riesgo de producir una perturbación estructural grave que cuando se cambian muchos de los otros restos (no cargados) en superficie a ácido glutámico. Fue también importante evitar los restos que estaban implicados en estudios estructurales o mutágenos previos al ser importantes en la fijación de PO₄ o cerca en el espacio de estos restos o de hecho cerca de la hendidura central en el medio de la molécula de PhoS. Se dio preferencia a los restos
- 15 de lisina que se proyectan muy lejos fuera de la superficie de la proteína y las lisinas que estaban situadas en o cerca de grandes grupos de restos básicos.

- Dichos grupos de restos básicos pueden formar un parche con carga significativo que puede interactuar con una matriz de purificación. Por lo tanto la colocación estratégica de uno o más restos ácidos puede romper dicho parche, es decir, alterar considerablemente la carga neta en dicha área y por lo tanto producir grandes cambios locales en la
- 20 capacidad para interactuar con una matriz de purificación. Por último, como el terminal C ya se alteró con la cola poliD que está situada en un extremo de la proteína PhoS en forma de balón de rugby partido' era deseable encontrar al menos algunos restos que estuvieran en el extremo opuesto de la proteína PhoS del terminal C.

Se identificaron las áreas siguientes que adaptaron estos criterios y que pudieron agruparse en secuencia lineal para facilitar métodos agrupados de mutagenia de PCR.

- 25 1) La mutación individual de K275E sobresale de una superficie cóncava y está muy próxima a K272 y está cerca de K282.
- 2) La mutación triple de K107, 109 y 110, K107 está cerca de K98 y E155, K109 aislada se proyecta fuera de PhoS, y K110 está en próxima a K109 muy cerca de D112, D113 y E114.

3) La mutación triple de K262, 265 y 266, K262 está distante de K265/266 pero próxima a K318, mientras que K265 y K266 conjuntamente forman una 'V' y un trío con N48

4) La mutación triple de K309, 313 y 318 están todas implicadas en un área grande y difusa con potencial para ser una superficie básica, estando todas contiguas a T310 y P319.

- 5 Los genes PhoS que codifican estas cuatro mutaciones se construyeron y probaron para la expresión en *E. coli* y el rendimiento de la purificación por intercambio catiónico a pH 4,5.

Se vio que la mutación individual de K275E (pDPH192) era muy poco tolerada por *E. coli* y/o se precipitó una vez que el extracto periplásmico se había ajustado a pH 4,5. Además, para la proteína que se recuperó de las células el rendimiento de la elución por intercambio catiónico no aumentó más del de la proteína PhoS poliD.

- 10 La mutación triple en K107/109/110E dio proteína no detectable tras la elución procedente del intercambio catiónico. Esto era debido a muy escasos niveles de expresión en *E. coli* (como se demuestra por la duración de la inducción) pero también posiblemente debido a precipitación mientras que el extracto periplásmico se ajustaba a pH 4,5. Sin embargo, como estas mutaciones eran las únicas que estaban en el extremo opuesto del 'balón de rugby' PhoS procedentes de la cola de poliD se dividió posteriormente en mutaciones individuales para ulterior análisis.

- 15 La mutación triple en K262/265/266E (pDPH193) eluyó del intercambio catiónico a NaCl 33 mM. Sin embargo el nivel de expresión/recuperación de PhoS después del intercambio catiónico se redujo en comparación con la PhoS natural, por lo tanto esta mutación triple se dividió también en las tres mutaciones individuales y todas las combinaciones de mutaciones dobles para ulterior análisis.

- 20 La mutación triple en K309/313/318E (pDPH194) había mejorado el rendimiento de la elución por intercambio catiónico en comparación con la PhoS poliD (73 mM frente a NaCl 83 mM respectivamente) y niveles normales de expresión, sin embargo la elución a 73 mM no mejoró suficientemente sobre la de la mutación individual de K318D + poliD (pDPH188) por lo tanto no se llevó a cabo más trabajo en estas mutaciones triples.

- 25 Tanto las mutaciones individuales K275E como K318D se combinaron con la mutación triple K262/265/266E (pDPH195 y pDPH194 respectivamente) a fin de investigar si dichas combinaciones podrían dar lugar a efectos adicionales o sinérgicos. Sin embargo, ambas todavía adolecieron de la expresión/recuperación baja en proteína observada ya con K262/265/266E.

- 30 La división de la mutación triple K107/109/110E en tres mutaciones individuales sugirió que la mutación K107E era responsable en gran medida de los efectos perjudiciales de esta triple mutación ya que las mutaciones individuales K109E y K110E fueron capaces de producir más proteína. Tanto K109E (pDPH199) como K110E (pDPH200) presentaban rendimiento de elución mejorado por intercambio catiónico (NaCl 52-55 mM) y mejor que K107E (pDPH198) a NaCl 70 mM. Por lo tanto K109 y 110E se combinaron (pDPH201) para probar los efectos adicionales/sinérgicos. Sin embargo, esta mutación doble K109/110E no pudo expresarse o recuperarse después del ajuste a pH 4,5. Esto sugiere que la zona de PhoS que están en K107/109/110 tiene algún efecto estructural o solvatante importante donde las tres partes contribuyen. K110E se seleccionó para estudios de combinatoria adicionales donde esta mutación parecía ser mejor tolerada que la K109E según se estima por la recuperación de proteínas.

- 35 Las tres mutaciones individuales K262, 265, 266E presentaban mejor rendimiento de la elución del intercambio catiónico sobre PhoS poliD sola: 68 mM, 60 mM y 58 mM respectivamente y todas tenían buenos niveles de expresión proteica. La combinación de éstas en mutantes dobles sugiere que es el resto K262 el que es crítico para mantener buenos niveles de expresión proteica (estructura/solubilidad) ya que cuando se combinan ya sea con K265E (pDPH205) o K266E (pDPH206) los autores observan niveles reducidos de expresión/recuperación de proteínas. Además ambos mutantes dobles no han mejorado el rendimiento de la elución por intercambio catiónico sobre el de los mutantes individuales de K265E o K266E. Sin embargo el mutante doble K265/266E (pDPH207) tiene buenos niveles de expresión/recuperación de proteínas y efectos aditivos sobre el rendimiento de la elución por intercambio catiónico, ya que esta proteína se eluye a 38 mM de NaCl (en comparación con 60 mM y 58 mM para las mutaciones individuales solas).

- 40 Se prepararon más mutantes en combinación para poner K265/266E junto con K110E y K318D. Se vio que el mutante de K110/265/266E (pDPH209) tiene mejor rendimiento de la elución por intercambio catiónico, eluyendo a 29 mM de NaCl y buenos niveles de expresión proteica. El mutante de K265/266E+K318D (pDPH211) tenía menor rendimiento de la elución por intercambio catiónico y de expresión proteica que la mutación de K265/266E sola. Por último un montaje de mutación "máxima" que contiene cuatro mutaciones además de la cola poliD: Se probó K110/265/266E + K318D (pDPH210). Sin embargo ésta adoleció de recuperación proteica reducida y no había mejorado el rendimiento de la elución por intercambio catiónico sobre K265/266E o K110/265/266E.

- 55 Por lo tanto se seleccionaron tres montajes de PhoS para ulterior análisis para representar mutaciones mínimas de PhoS con mejor rendimiento de la elución por intercambio catiónico: PhoS poliD, PhoS K265/266E poliD y PhoS K110/265/266E poliD. La elución de las tres mutaciones a concentraciones salinas menores que la PhoS natural debe permitir la separación de la PhoS mutante del Fab' por gradiente o la elución de la etapa procedente de la

columna de intercambio catiónico. Alternativamente, dependiendo del pI de los mutantes puede ser posible evitarlas fijándose a la columna de intercambio catiónico al aumentar el pH de los tampones sin afectar la fijación de Fab'. Otra alternativa puede ser basarse en la etapa de intercambio aniónico para eliminar la PhoS mutada. Los pI de las proteínas PhoS mutantes se determinan a continuación.

5 Ejemplo 5

Efecto de la mutagenia de PhoS en la integridad de la proteína y el pI.

- Se obtuvieron proteínas PhoS mutantes que tenía una pureza >95% por intercambio catiónico con elución en gradiente. Se evaluó por SDS-PAGE y espectrometría de masas la integridad de la proteína y su cola del terminal C. Las masas medidas por MS se muestran en la Tabla 2. Todas muestran estrecha concordancia con la masa prevista tanto al confirmar que las proteínas eran de correcta identidad como también que la cola poliD estaba intacta. La SDS-PAGE mostrada en la figura 3 confirma tanto el nivel de pureza de estas preparaciones como presenta una migración ligeramente más lenta para las proteínas PhoS que contienen poliD en comparación con las naturales. Los geles de IEF (Figura 4) demuestran que la PhoS natural tiene un pI de ~7,2 mientras que la adición de la cola poliD sola reduce el pI a ~5,1. Sucesivas adiciones de mutaciones de K a E o D en superficie producen desplazamientos adicionales de pI que oscilan desde ~4,9 para PhoS K/D poliD hasta ~4,8 para PhoS K265/266E poliD y ~4,5 para PhoS K110/265/266E + K318D poliD.

Ejemplo 6

Pruebas de la integridad funcional de proteínas PhoS mutantes: Complementación de un genotipo de *phoS* con PhoS transmitida por plásmido.

- Se utilizó la cepa ANCC75 de *E. coli* (Amemura *et al.*, 1982) para proporcionar un fondo genético de *phoS*. Estas células tienen permanentemente un fenotipo ya que si están carentes de PO₄ y por lo tanto debido a retroalimentación mediante el regulón *pho* producen altas concentraciones de fosfatasa alcalina incluso en presencia de PO₄. EL cultivo de dichas células en medio sólido que contiene XP puede distinguirse entre las células que tienen altas o bajas concentraciones de fosfatasa alcalina. La transformación de dichas células con plásmidos que codifican PhoS natural, PhoS poliD, PhoS K265/266E poliD y PhoS K110/265/266E poliD o un plásmido de referencia confirmó que todas las proteínas PhoS mutantes tenían capacidad para complementar la pérdida de la PhoS cromosómicamente codificada.

- Repetiendo el mismo experimento en medio líquido que está 'exento de fosfato' (muy bajo en PO₄) utilizando W3110 de *E. coli* natural como referencia se demostró (Figura 5) que todas las proteínas PhoS mutantes probadas eran capaces de complementar el 100% del fenotipo de *phoS* en condiciones de bajo PO₄ (véase el punto de tiempo de 5 horas) y también de complementar parcialmente el fenotipo de *phoS* en condiciones exentas de PO₄ (véanse los puntos de tiempo de 22, 27 y 47,5 horas).

Ejemplo 7

Estabilizando cepas integradas de *E. coli* que expresan proteínas PhoS mutantes.

- Los genes que codifican tres proteínas mutantes PhoS (poliD, K265/266E poliD y K110/265/266E poliD) se ensamblaron junto con una longitud de la zona cromosómica contigua a 3' en el plásmido pKO3 de sustitución cromosómica. Además se hizo una versión nula de PhoS con un oligonucleótido que tenía dos codones de terminación en el marco en la zona codificadora del péptido señal (plásmidos pDPH217-220 respectivamente). Éstos se electroporaron en W3110 de *E. coli* y probaron por recombinación y curado con plásmido como se describió en los métodos. Se realizó un cribado final por PCR de colonias aisladas de supuestos episodios de integración utilizando los oligos de identificación mostrados en la Tabla I junto con oligos ordinarios adecuados en la cadena opuesta para probar si las colonias tenían PhoS natural o mutante integrada en el cromosoma. La PCR de ADN cromosómico (en células *E. coli* completas) con dos oligos (*Dra* I directo y *Bst*B I inverso) que se hibridan fuera de la zona de ADN que se codificó en pKO3 utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Precision plus Taq), seguida de secuenciación directa del producto de la PCR purificado en gel se utilizó para confirmar que los cambios correctos se habían incorporado en el cromosoma. Esto dio lugar a la producción de las cuatro cepas de *E. coli* siguientes: DPH1 codifica PhoS poliD, DPH2 codifica PhoS K265/266E poliD, DPH3 codifica PhoS K110/265/266E poliD, DPH4 codifica PhoS nula.

Ejemplo 8

- 50 Prueba de expresión y purificación de Fab' procedente de la cepa DPH3.

- La cepa DPH3 se transformó con un plásmido que expresa el Fab' deseado. Se llevó a cabo una fermentación convencional y no se observaron deficiencias o dificultades obvias durante la fase de cultivo o inducción. Las muestras tomadas a lo largo de la fermentación se analizaron de la manera habitual por ELISA después de la extracción con Tris/EDTA. Los datos en la figura 6 demuestran que el cultivo era normal y que la acumulación de Fab' en el periplasma era de unos 380 mg/l en la recolección, bien dentro del intervalo normal para este Fab'. Se vio

que los sedimentos celulares eran firmes y fáciles de volver a poner en suspensión tras la centrifugación, normalmente una señal de buena integridad celular.

Los sedimentos que representan 50 ml de recolección del cultivo se extrajeron durante la noche a 30°C en Tris/EDTA, a continuación se preparó para purificación por intercambio catiónico como se describió anteriormente. El pH se aumentó desde 4,5 hasta 5,0 de manera que la PhoS mutante de la cepa DPH3 (pI 4,5) no se fijara a la columna de intercambio catiónico pero sí lo hiciera el fragmento Fab'. La conductividad era de 3,0 mS/cm. La muestra se aplicó a una columna de sefarsa SP de 5ml y se cargó, las muestras a contracorriente y elución se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie. Las muestras se concentraron cuando procedió utilizando columnas de centrifugación de 10 kDa de umbral para permitir la visualización con geles teñidos con Coomassie.

- 5 El gel de SDS-PAGE en la figura 7 demuestra que a estas condiciones de pH y conductividad la PhoS mutante procedente de DPH3 no se fija a la columna de sefarsa SP, mientras que la PhoS natural procedente de W3110 no se fija. Esto significa que para DPH3 la PhoS mutante y Fab' aparecen en diferentes fracciones: elución a contracorriente y con NaCl 200 mM respectivamente, mientras que para W3110 ambas proteínas aparecen en la elución con NaCl 200 mM.
- 10 Para confirmar que cualquier PhoS restante se habría eliminado también por intercambio aniónico, las fracciones de la elución a contracorriente y con NaCl 200 mM procedentes tanto de experimentos con DPH3 como con W3110 se concentraron, desalaron e intercambiaron tampón para Tris.Cl 20 mM pH 8,0 y se introdujeron en intercambio aniónico. Se demuestra que el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie mostrado en la figura 8 para DPH3 PhoS se fija a la columna de intercambio aniónico separándolo por lo tanto del Fab'. Sin embargo, la PhoS natural procedente de W3110 no se fija a la columna y circula a contracorriente y contamina la solución de Fab'.
- 20

Ejemplo 9

Ensayo de purificación de un fragmento Fab' expresado en las cepas DPH1, DPH2 y DPH3

Las cepas DPH1, DPH2 y DPH3 se transformaron con un plásmido que expresa un Fab' con un pI mayor que el Fab' utilizado en el ejemplo 8 que se suele purificar en intercambio iónico a pH 6. Se llevó a cabo una fermentación normal y se probó la separación de las variantes de PhoS procedentes del Fab por cromatografía de intercambio catiónico como se describió anteriormente a pH 5, 5,5 y 6.

- 25 pH 5,0
- Los resultados de una purificación realizada a pH 5,0 se muestran en las figuras 9 y 10. A pH 5 PhoS poliD (DPH1) no aparece en la circulación a contracorriente según se estima por tinción de Coomassie (Fig. 9, banda 2) pero de hecho eluye de la columna con Fab'-B (Fig. 9, banda 3). El análisis de inmunotransferencia más sensible con una anti-PhoS policlinal y una anti-Fd monoclonal demuestra claramente que Fab'-B se fija fuertemente a la columna junto con una gran cantidad de PhoS poliD (Fig. 10, banda 3). Sin embargo la fracción a contracorriente (banda 2) también tiene alguna PhoS poliD. Esto puede representar que la asociación de PhoS poliD con la matriz cromatográfica es débil a pH 5,0.
- 30

- 35 En cambio DPH2 que codifica PhoS K265/266E poliD tiene una banda de PhoS distinta teñida con Coomassie en la circulación a contracorriente (Fig. 9, banda 5). La inmunotransferencia de anti-PhoS presenta solamente una cantidad de PhoS residual en la fracción de eluido (Fig. 10, banda 6). Por lo tanto PhoS K265/266E poliD no se fija eficazmente a sefarsa SP a pH 5,0.

- 40 La cepa DPH3 codifica la PhoS K110/265/266E poliD mutada al máximo y de nuevo la PhoS aparece en la circulación a contracorriente (Fig. 9, banda 8) mientras que la inmunotransferencia presenta una reducción adicional en la cantidad de PhoS residual en la fracción de eluido (Fig. 10, banda 9) que la de DPH2 (Fig. 10, banda 6). Esto apoya el observación anterior in el ejemplo 8 de que las propiedades cromatográficas de DPH3 son más capaces de actuar a bajo pH (pH ~4,7-5,0) que DPH2.

- 45 Las propiedades de fijación de la PhoS natural codificada por la cepa W3110 original cuando se carga a pH 5,0 se muestran en la banda 12 de la Fig. 9. Las inmunotransferencias de anti-PhoS muestran la gran mayoría de la PhoS natural en la fracción de eluido aunque una cantidad residual puede detectarse en la circulación a contracorriente (Fig. 10, bandas 11 y 12). (Las cantidades residuales de PhoS detectadas por inmunotransferencia en la fracción de eluido en estos experimentos puede ser un reflejo de la cantidad mínima de la columna de lavado usada durante este rápido método analítico, mientras que PhoS natural residual en la circulación a contracorriente puede representar una débil fijación a la columna o un artefacto frontal columna/tampón).
- 50

pH 5,5

Cuando se analizan las tres cepas para la purificación de PhoSa pH 5,5, solamente el rendimiento de DPH1 cambia fuertemente en comparación con el de pH 5,0. A pH 5,5 la PhoS poliD codificada por DPH1 se encuentra ahora en la fracción a contracorriente de un gel teñido con coomassie (Fig. 11, banda 2), lo cual se confirma por la transferencia de anti-PhoS (Fig. 12, bandas 2+3). DPH2 y DPH3 codifican mutantes de PhoS que están en la circulación a

- 55

contracorriente a pH 5,5. La PhoS natural codificada por W3110 tiene rendimiento indefinido. El gel teñido con coomassie demuestra que la mayor parte de PhoS está en la circulación a contracorriente a pH 5,5 (Fig. 11, banda 11), mientras que la transferencia de anti-PhoS sugiere que existe todavía una porción significativa (~40%) en la fracción de eluido. Por lo tanto a este pH, PhoS debe estar cerca de su pl operativo y tiene solamente débil fijación.

5 pH 6,0

Las tres cepas mutantes y la W3110 natural producen PhoS que no se fija a sefarosa SP a pH 6,0 (Fig. 13, bandas 2, 5, 8 y 11) como se muestra por un gel teñido con coomassie. El análisis con una anti-PhoS policlonal demuestra que todas tienen las mismas concentraciones residuales de PhoS detectable en la fracción de eluido (Fig. 14 bandas 3, 6, 9, 12). Por lo tanto no hay ventaja en la utilización de cepas DPH1, 2 o 3 sobre la W3110 natural si las purificaciones por intercambio catiónico se hacen a este pH. Sin embargo, la presencia de la cola poliD en las cantidades residuales de la PhoS en la fracción de eluido puede producir más separación de PhoS y Fab' en la segunda columna de intercambio aniónico mucho más fácil, ya que la etiqueta del terminal C actúa con eficacia como una etiqueta de afinidad cuando la columna se opera en modo a contracorriente.

- 10 purificaciones por intercambio catiónico se hacen a este pH. Sin embargo, la presencia de la cola poliD en las cantidades residuales de la PhoS en la fracción de eluido puede producir más separación de PhoS y Fab' en la segunda columna de intercambio aniónico mucho más fácil, ya que la etiqueta del terminal C actúa con eficacia como una etiqueta de afinidad cuando la columna se opera en modo a contracorriente.
- 15 Los resultados resumidos en la Tabla 3, demuestran que cuando se ensaya la purificación en muestras de fermentación de 50 ml que los tres intervalos de mutación de PhoS: PhoS poliD, PhoS K265/266E poliD y PhoS K110/265/266E poliD todas tienen características de purificación mejoradas en serie. En estos experimentos, estas mejoras se demuestran al disminuir el pH al cual la PhoS puede encontrarse que está en modo a contracorriente de una aplicación acidificada para una columna de sefarosa SP. Por lo tanto las proteínas con el número mayor de mutaciones pueden separarse a partir de Fab' en condiciones de fijación a pH cada vez más severo. Esto apoya la
- 20 lectura anterior de la menor concentración de NaCl requerida para eluir estas formas de PhoS fuera de una columna de sefarosa SP a pH 4,5 (NaCl ~103 mM, 83 mM, 38 mM y 29 mM para W3110, DPH1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 3)).

Tabla 3. Características de la cepa Phos mutante

Cepa	Tipo PhoS	pl en IEF	pH para separación de Fab'-B
W3110	natural	7,0	6,0
DPH1	PhoS poliD	5,1	5,5
DPH2	PhoS K265/266E poliD	~4,8	5,0
DPH3	PhoS K110/265/266E poliD	~4,6	4,7-5,0

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CELLTECH R&D LIMITED DAVID, HUMPHREYS ANDREW, CHAPMAN MARTYN, ROBINSON MARI, SPITALI
- 5 <120> CÉLULAS HOSPEDADORAS DE *E. COLI* MODIFICADAS
- <130> PA 519
- 10 <150> GB0224082.8
- <151> 16-10-2002
- <160> 31
- 15 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- 20 <213> *Escherichia coli*
- <400> 1
- gtaattgact gaatatcaac g 21
- 25 <210> 2
- <211> 42
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- 30 <400> 2
- ctgtactaat aagcttcag gccgggtacg gtgttttacg cc 42
- 35 <210> 3
- <211> 42
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- 40 <400> 3
- cggcctggaa gcttattagt acagcggctt accgctactg tc 42
- <210> 4
- 45 <211> 24
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 4
- 50 ccgactcttt catcatcacc gggg 24
- <210> 5
- <211> 60
- 55 <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 5
- 60 cggcctggaa gcttattaat cgatcatgac atcgctgtac agcggcttac cgctactgtc 60
- <210> 6
- <211> 73
- <212> ADN
- 65 <213> *Escherichia coli*

ES 2 541 358 T3

<400> 6

cggcctggaa gcttattaat cgtcatcgtc atcgtcgtac agcgggtccc cgctactgtc 60
tttaatatgg gtc 73

5 <210> 7
<211> 63
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

10 <400> 7
cgccgcgacc ttatcgatga gtgcttaata agtgattgaa gaagcaagcc tgacagggtgc 60
agg 63

<210> 8
15 <211> 23
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 8
20 gcgttcgttc agcgtctgcc ggg 23

<210> 9
<211> 21
25 <212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 9
30 ctgcttcgcg taagcatatt c 21

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
35 <213> *Escherichia coli*

<400> 10
ccaatattaa agacagtagc gg 22

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 11
cattttgtaa tgccggatgc ggcg 24

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 12
ctgagcttgc gcctggctgg c 21

<210> 13
60 <211> 21
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 13

gctgccagca gctcaatggc g 21

<210> 14
5 <211> 24
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 14
10 tacgacgatg acgatgacga ttaa 24

<210> 15
<211> 21
15 <212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 15

20 gcttaataag tgattgaaga a 21

<210> 16
<211> 90
<212> ADN
25 <213> *Escherichia coli*

<400> 16

ctgaagtccg gagaactggt gctggatggt aaaaccctcg gcgacatcta cctgggcgaa 60
atcaagaagt gggatgatga agccatcgcc 90

30 <210> 17
<211> 90
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

35 <400> 17

ctgaagtccg gagaactggt gctggatggt aaaaccctcg gcgacatcta cctgggcgaa 60
atcgaagaat gggatgatga agccatcgcc 90

40 <210> 18
<211> 90
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

45 <400> 18

ctgaagtccg gagaactggt gctggatggt aaaaccctcg gcgacatcta cctgggcaaa 60
atcgaaaagt gggatgatga agccatcgcc 90

<210> 19
50 <211> 90
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 19

55 ctgaagtccg gagaactggt gctggatggt aaaaccctcg gcgacatcta cctgggcaaa 60
atcgaagaat gggatgatga agccatcgcc 90

<210> 20
60 <211> 90
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

ES 2 541 358 T3

	<400> 20		
	ctgaagtccg gagaactggt gctggatggt aaaaccctcg gcgacatcta cctgggcaaa	60	
	atcaaggaat gggatgatga agccatcgcc	90	
5	<210> 21		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
10	<400> 21		
	gtgctggaat tcttcgactg ggcgtacaaa acc	33	
	<210> 22		
15	<211> 84		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
	<400> 22		
20	gaagatgcat ggcctattac ctctaccacg ttcattctga tccacgaaga tcaggaagaa	60	
	ccagaacaag gcacagaagt gctg	84	
	<210> 23		
	<211> 84		
25	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
	<400> 23		
	gaagatgcat ggcctattac ctctaccacg ttcattctga tccacgaaga tcaggaaaaa	60	
30	ccagaacaag gcacagaagt gctg	84	
	<210> 24		
	<211> 84		
	<212> ADN		
35	<213> <i>Escherichia coli</i>		
	<400> 24		
	gaagatgcat ggcctattac ctctaccacg ttcattctga tccacgaaga tcagaaggaa	60	
40	ccagaacaag gcacagaagt gctg	84	
	<210> 25		
	<211> 84		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
45	<400> 25		
	gaagatgcat ggcctattac ctctaccacg ttcattctga tccacgaaga tcagaagaaa	60	
	ccagaacaag gcacagaagt gctg	84	
50	<210> 26		
	<211> 84		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
55	<400> 26		
	gaagatgcat ggcctattac ctctaccacg ttcattctga tccacaaaga tcaggaagaa	60	
	ccagaacaag gcacagaagt gctg	84	
	<210> 27		

ES 2 541 358 T3

<211> 84
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5 <400> 27

gaagatgcat ggctattac ctctaccacg ttcattctga tccacaaaga tcaggaaaaa 60
 ccagaacaag gcacagaagt gctg 84

<210> 28
 10 <211> 84
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 28

15 gaagatgcat ggctattac ctctaccacg ttcattctga tccacaaaga tcagaaggaa 60
 ccagaacaag gcacagaagt gctg 84

<210> 29
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 29

25 cagttctcg gacttcagcc ctggaatgt aaccgc 36

<210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> *Escherichia coli*

<400> 30

gtcgaagaat tccagcactt ctgtgccttg ttctgg 36

35 <210> 31
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

40 <400> 31

cgataagctt attaatcgtc atcgtcacg tgcgtacagcg gttcaccgct actgtcttca 60
 atattgggtt cccacgcagc gcgaacctgt tcaac 95

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora *E. coli* que expresa un anticuerpo recombinante caracterizada por que la célula hospedadora *E. coli* ha sido modificada genéticamente para cambiar el punto isoelectrico de la proteína PstS de fijación de fosfato de *E. coli* y en donde el punto isoelectrico se ha alterado mediante:
- 5 la adición de una etiqueta de poliácido aspártico al terminal C de la proteína de fijación al fosfato y/o el cambio de uno o más restos de aminoácido situados en la superficie de la proteína PstS de fijación de fosfato de *E. coli* por:
 - (a) sustitución de uno o más restos de lisina y/o arginina por ácido aspártico o ácido glutámico o
 - (a) sustitución de uno o más restos de ácido aspártico y/o ácido glutámico por lisina o arginina.
- 10 2. La célula hospedadora de la reivindicación 1, donde el punto isoelectrico de la proteína PstS de fijación de fosfato se ha reducido al sustituir una o más lisinas en los restos 110, 265, 266 o 318 por glutamina o ácido aspártico.
3. La célula hospedadora de la reivindicación 1, donde el punto isoelectrico de la proteína PstS de fijación de fosfato se ha reducido mediante la adición de una etiqueta de poliácido aspártico al terminal C.
- 15 4. La célula hospedadora de la reivindicación 1, donde el punto isoelectrico de la proteína PstS de fijación de fosfato se ha reducido mediante la sustitución de las lisinas en los residuos 265 o 266 con glutamina y mediante la adición de una etiqueta de poli-ácido aspártico al terminal C.
5. La célula hospedadora de la reivindicación 1, donde el punto isoelectrico de la proteína PstS de fijación de fosfato se ha reducido mediante la sustitución de las lisinas en los residuos 110,265 o 266 por glutamina y mediante la adición de una etiqueta de poli-ácido aspártico al terminal C.
- 20 6. La célula hospedadora de las reivindicaciones 1-5, donde el anticuerpo recombinante es un fragmento Fab o Fab'.
7. Un método de preparación de un anticuerpo recombinante que comprende la fermentación de una célula hospedadora según las reivindicaciones 5 o 6.

Figura 1

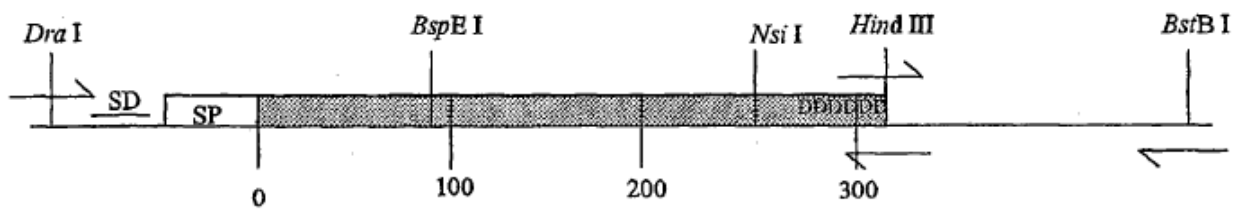


Figura 2

kDa

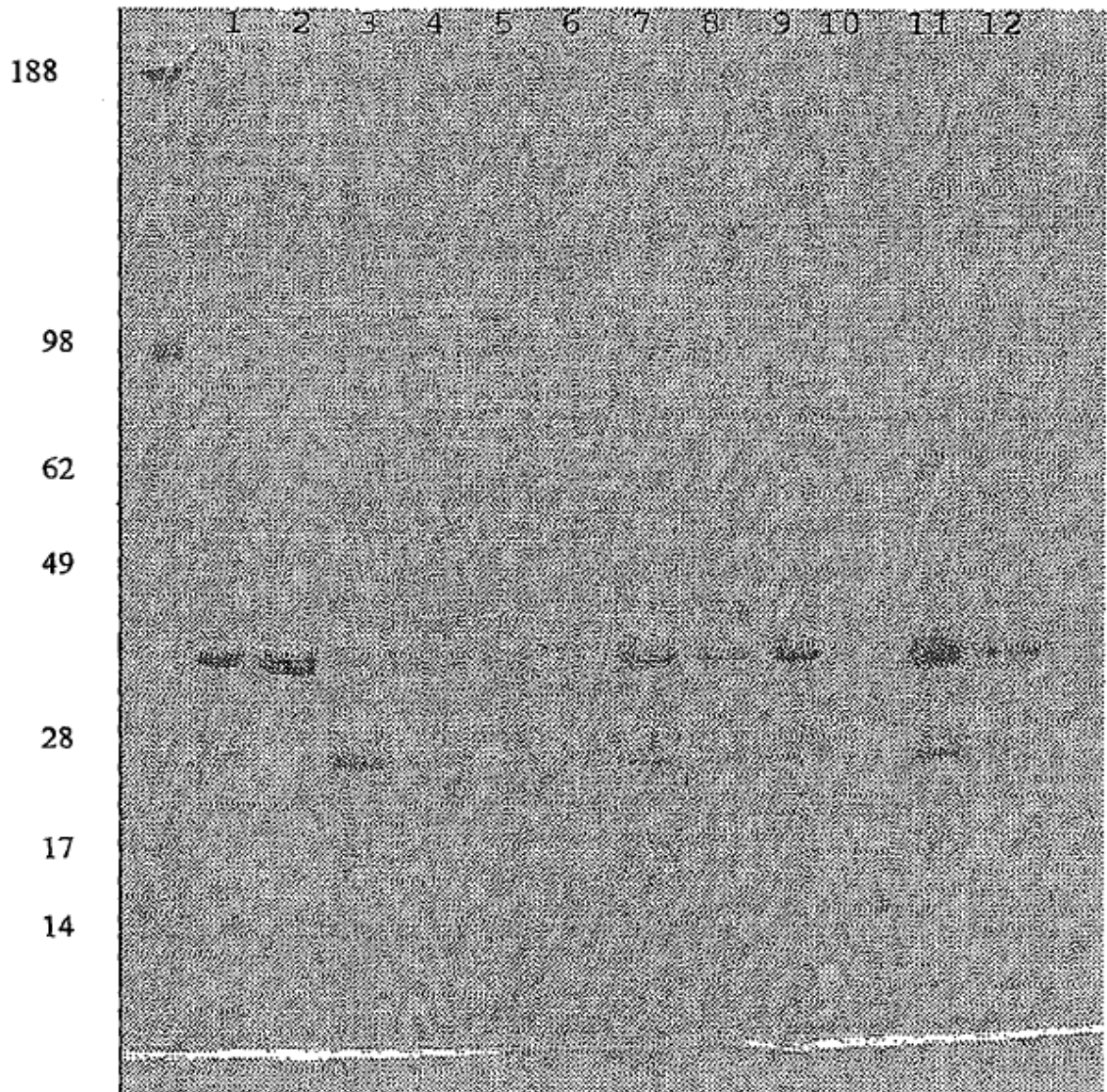


Figura 3

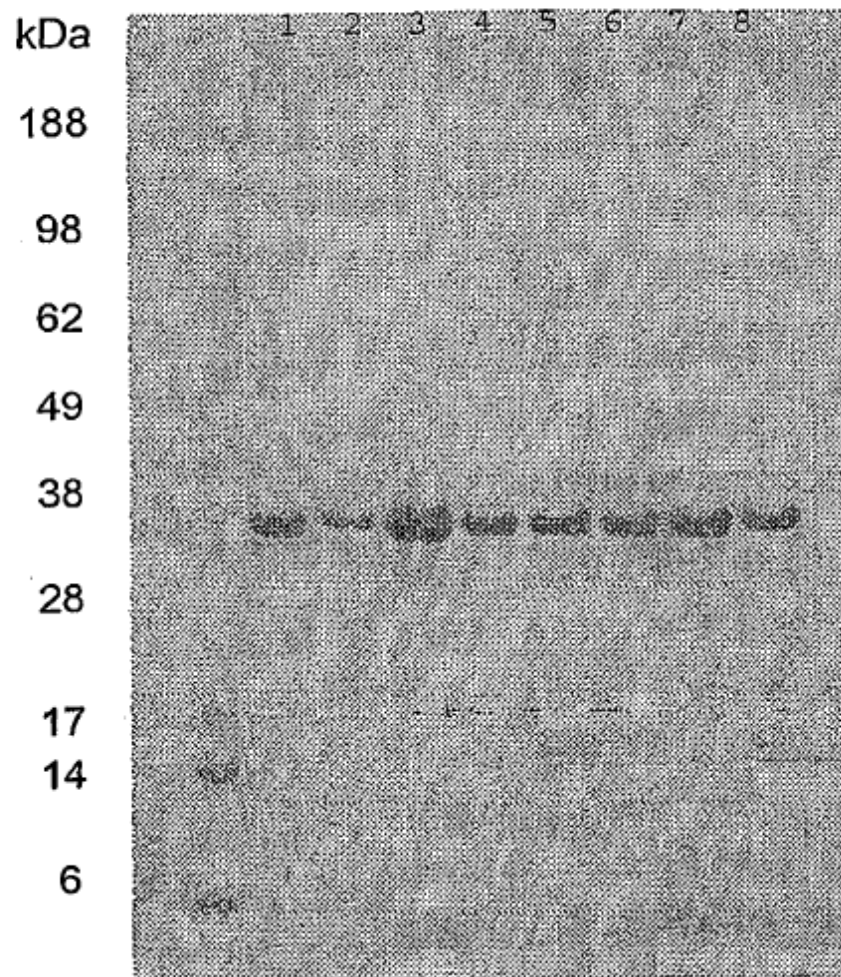


Figura 4

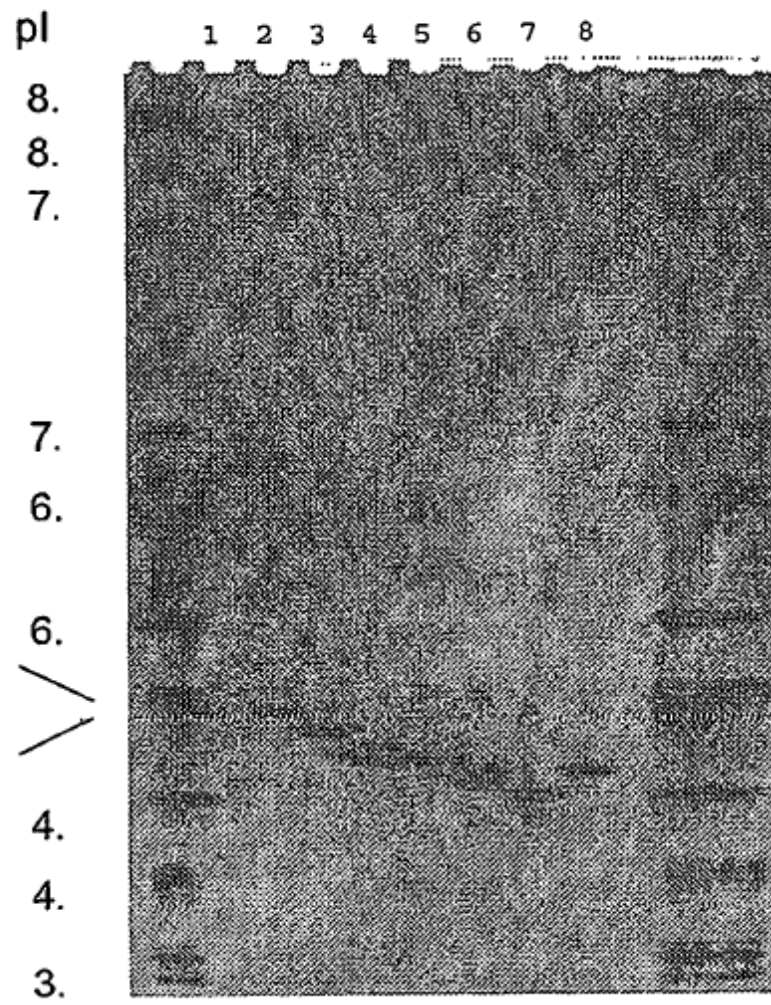


Figura 5

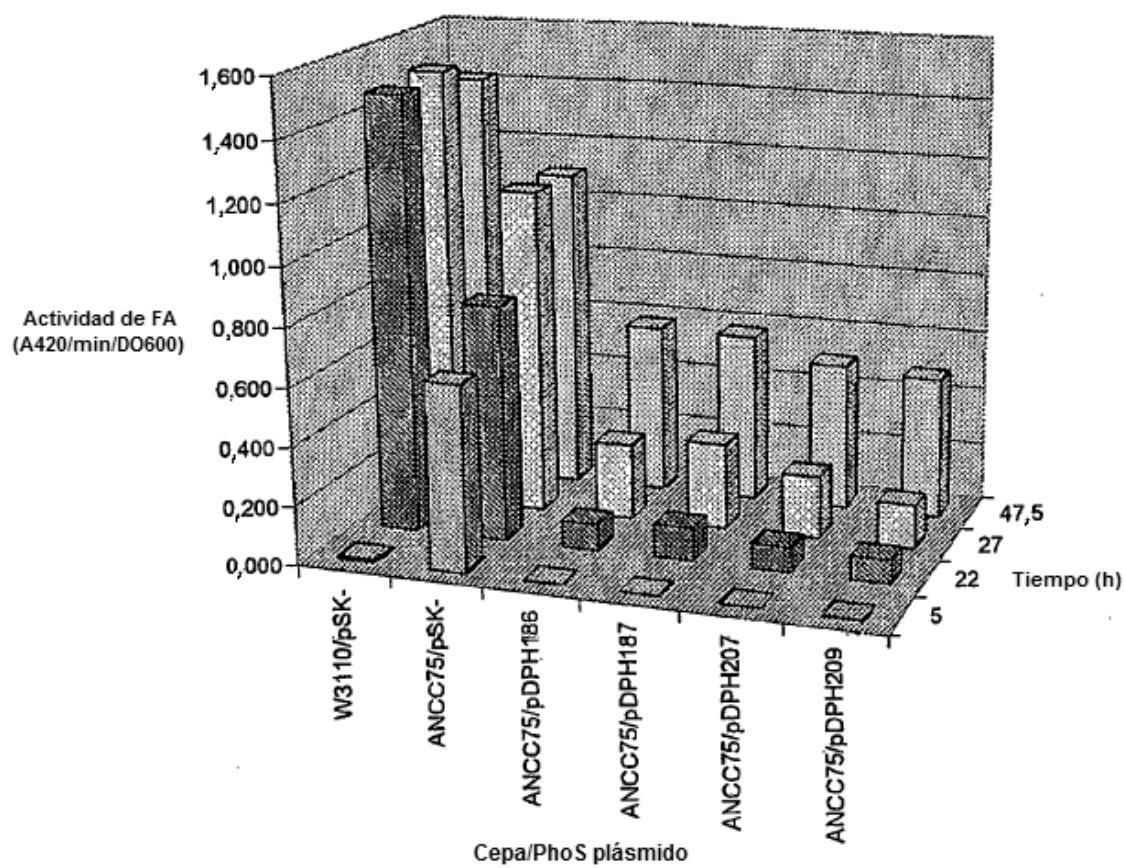


Figura 6

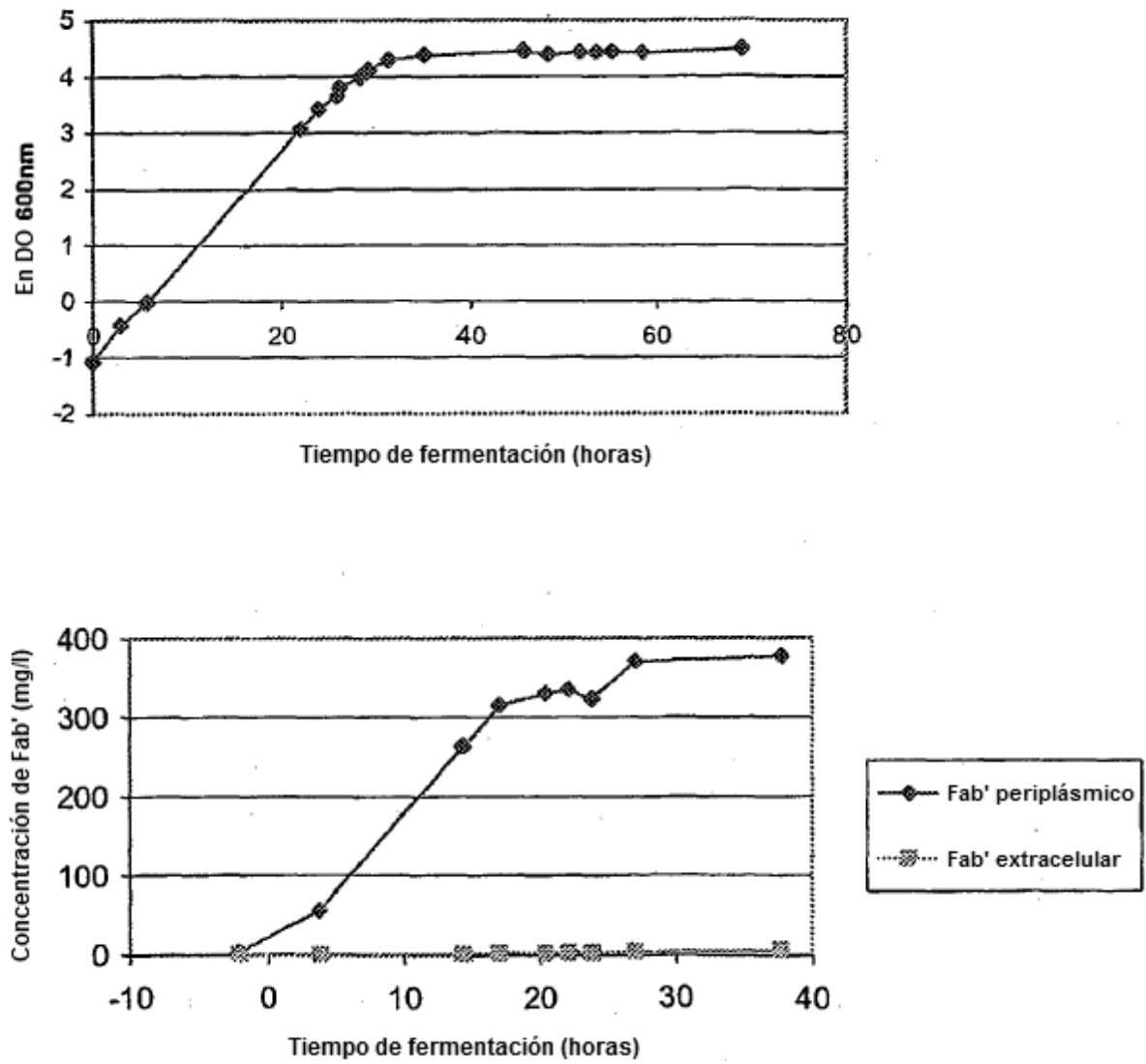


Figura 7

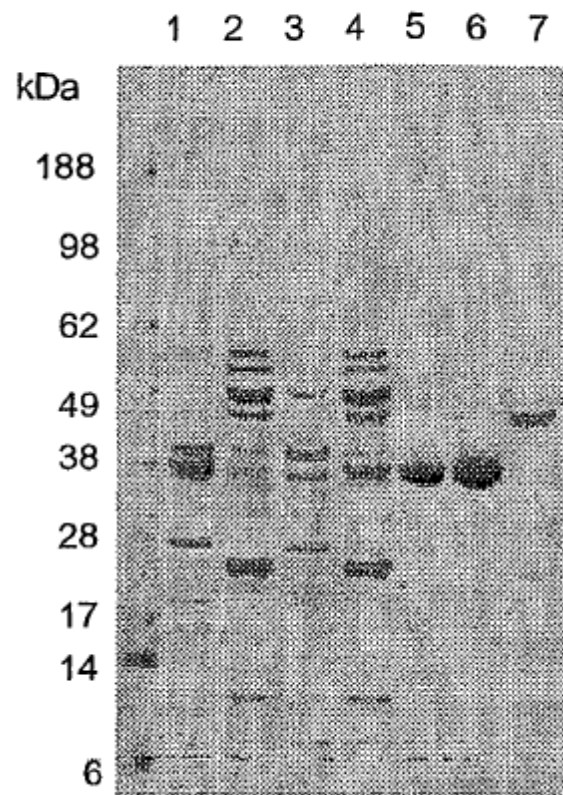


Figura 8

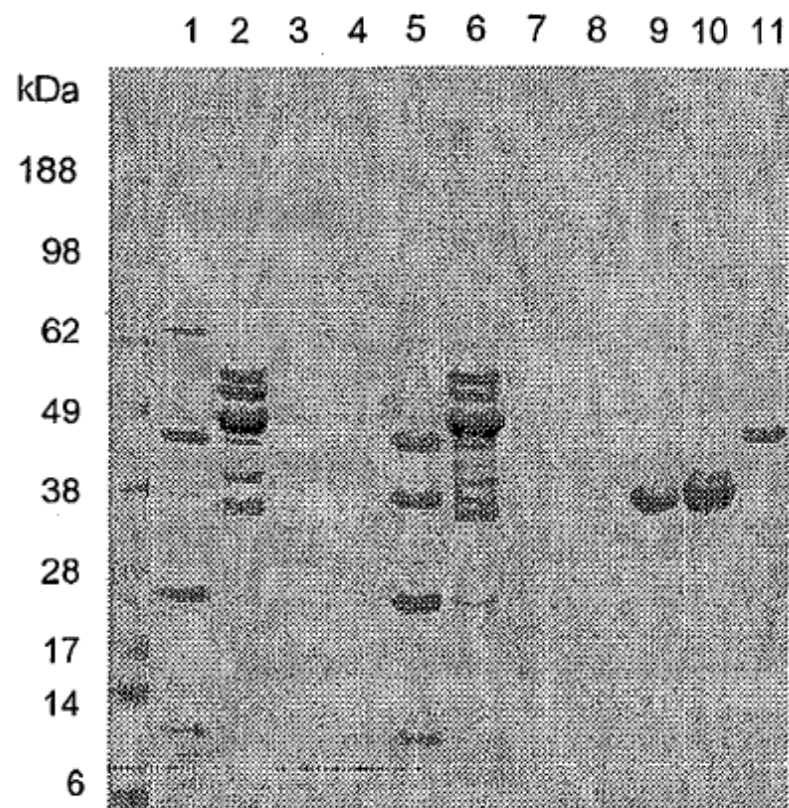


Figura 9

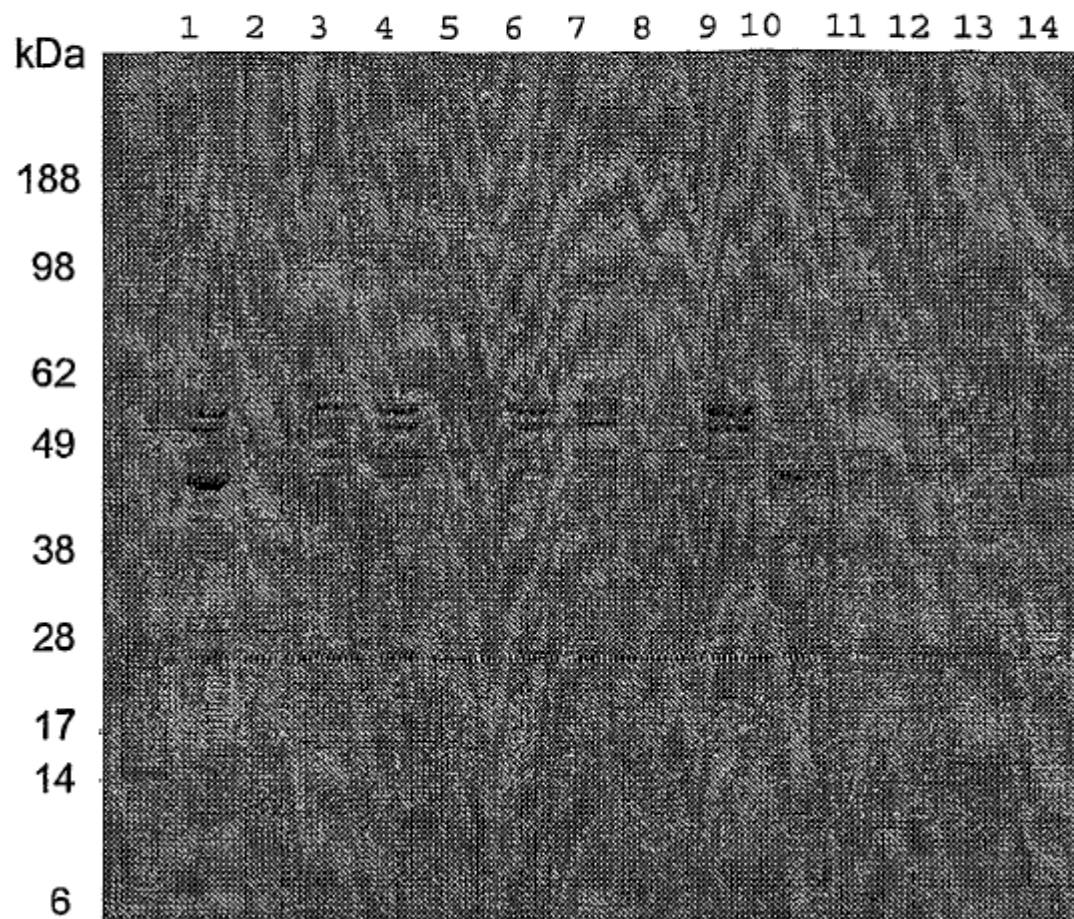


Figura 10

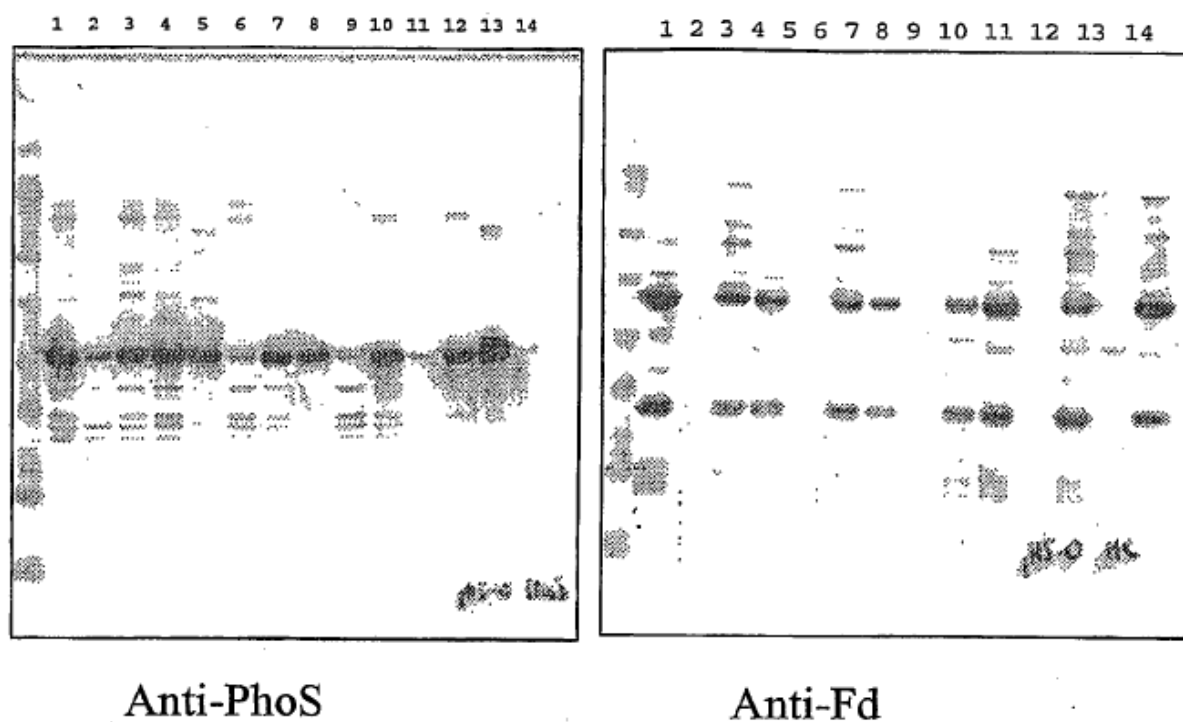


Figura 11

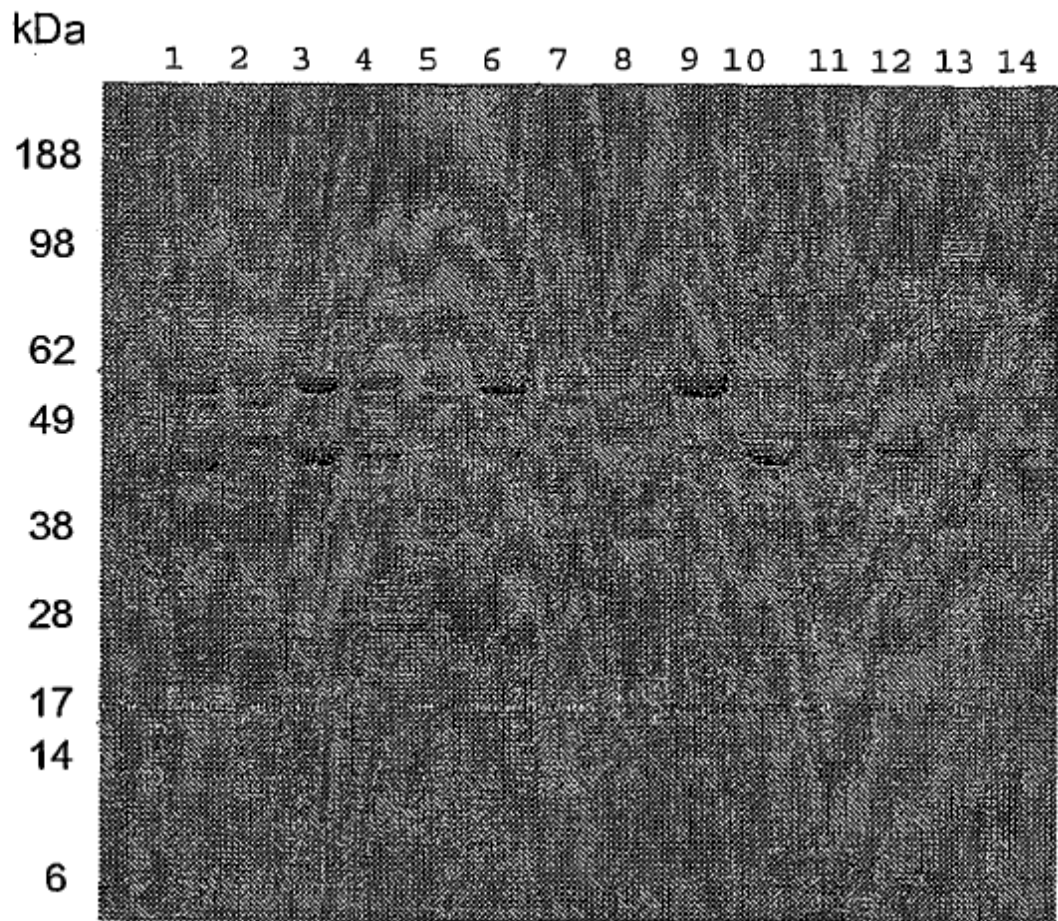


Figura 12

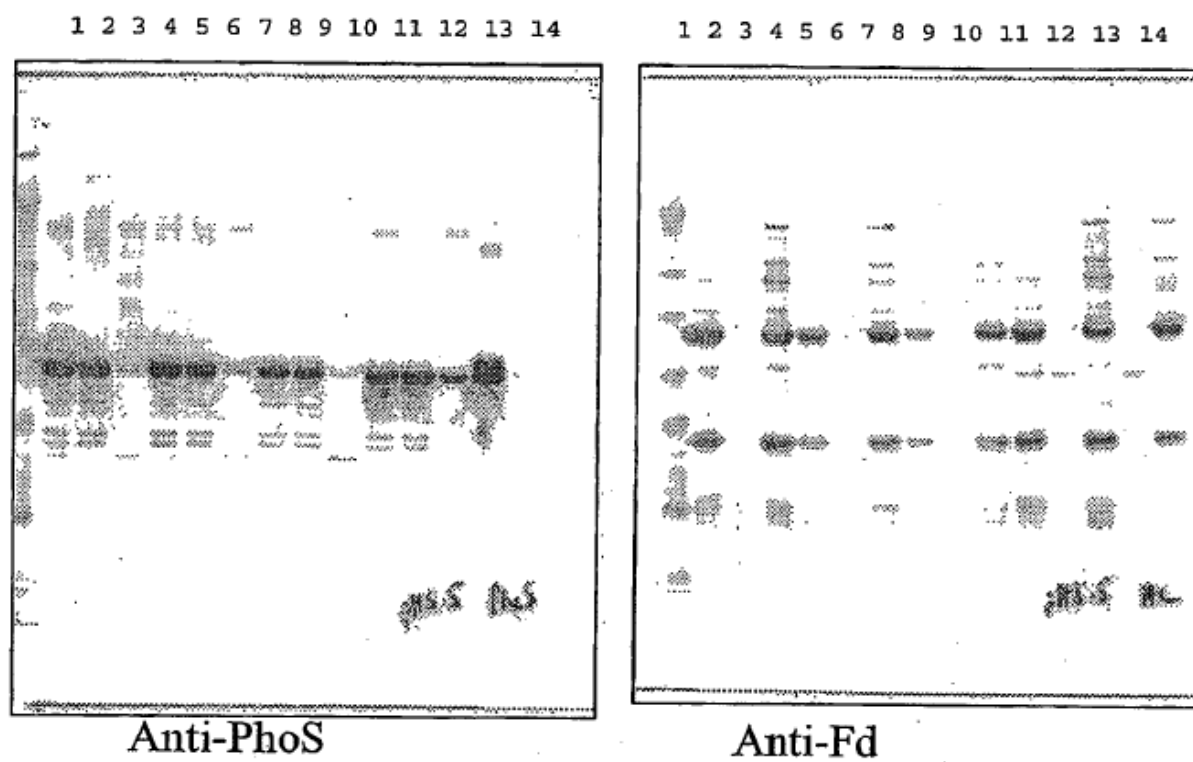


Figura 13

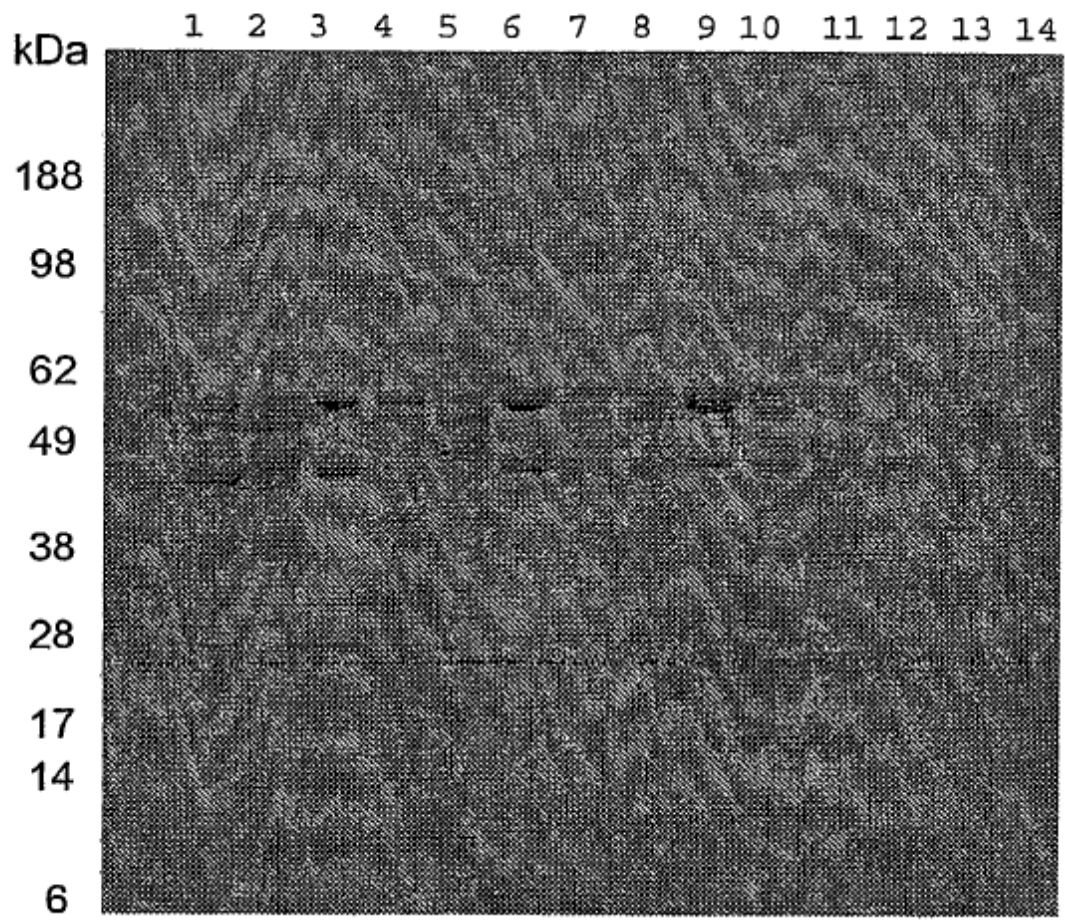


Figura 14

