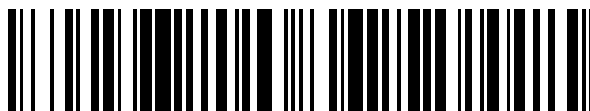


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 664**

51 Int. Cl.:

C12N 15/68 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2006** **E 06829913 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 1945772**

54 Título: **Nuevo sistema de selección**

30 Prioridad:

06.10.2005 EP 05109274

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2016

73 Titular/es:

ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS S.A.
(100.0%)
20 rue Diesel
01630 Saint Genis Pouilly, FR

72 Inventor/es:

MARTIN, FRANCK;
CENCIONI, STEFANO;
COLAGRANDE, ANTONELLA;
THALLER, MARIA CRISTINA;
D'ANDREA, MARCO MARIA y
ROSSOLINI, GIAN MARIA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 562 664 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

Nuevo sistema de selección

5 Breve descripción de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para producir una proteína recombinante que comprende el uso de un método de selección que no sea antibióticos. En particular, se refiere a un sistema hospedador/vector estable basado en la complementación del gen *pyrC* diseñado para producir un alto nivel de proteína recombinante heteróloga en *Escherichia coli*.

Estado de la técnica

[0002] Los sistemas de expresión de proteínas heterólogas comúnmente utilizan plásmidos para clonar y expresar genes de interés en los microorganismos. Cuando estos fragmentos de ADN de replicación autónoma se utilizan como vectores de expresión de la proteína, su diseño se basa siempre en i) un origen de replicación para asegurar la replicación autónoma; ii) un promotor para conducir la transcripción del gen de interés; y iii) un gen de selección para facilitar la selección de células que lleva el plásmido.

[0003] Los genes de selección codifican por lo general para enzimas que confieren resistencia a los antibióticos, que se utilizan durante las etapas de clonación y crecimiento del cultivo. Durante la clonación, la presencia de un antibiótico en las placas permite la selección de las células que han incorporado el plásmido durante la transformación, facilitando la identificación de las unidades formadoras de colonias (ufc) recombinantes. En el caso de crecimiento en cultivo líquido, la adición del antibiótico apropiado en el caldo de cultivo, evitará la pérdida del plásmido y mantendrá la población de células homogénea. Con el tiempo, el vector de expresión se pierde, ya que la carga metabólica global del microorganismo favorece el crecimiento de las células sin plásmido. Esto disminuye el rendimiento de expresión de proteínas recombinantes. Por lo tanto, tener un cultivo homogéneo; en el que cada célula albergue un vector de expresión es muy importante para obtener una producción elevada de la proteína recombinante. La dilución progresiva de los microorganismos que producen la proteína recombinante dará lugar a la "dilución" de la proteína recombinante en el hospedador. Este fenómeno se amplifica aún más si el caldo de cultivo es un medio pobre, tal como uno sintético, en el que el microorganismo tendrá que sintetizar la mayoría de sus metabolitos.

[0004] Con el fin de evitar la pérdida del plásmido, se suele añadir al medio de cultivo, donde se clona el gen que codifica la resistencia en el vector de expresión, una presión selectiva, como la que se deriva del uso de un antibiótico. El sistema más común utiliza ampicilina y el gen de β -lactamasa relacionado cuyo producto hidroliza el antibiótico presente en el medio. Este tipo de mecanismo de acción conduce a la desaparición progresiva de la ampicilina en el medio a medida que progresa el cultivo y aumenta el número de células. Dado que la ampicilina es un fármaco bacteriostático, las células sin plásmido (es decir, células no transformadas) comenzarán a proliferar tan pronto como la concentración de antibiótico restante lo permita. Este fenómeno de retraso en el crecimiento es particularmente visible en las placas, en donde después de un tiempo, alrededor de las principales unidades formadoras de colonias (ufc) comienzan a crecer los llamados "satélites".

[0005] Para frustrar el retraso en el crecimiento de las células no transformadas y, por lo tanto, obtener una gran homogeneidad del cultivo, la concentración de ampicilina se puede aumentar en el precultivo (I) o reemplazarse por compuestos bactericidas, tales como la kanamicina o la tetraciclina. La kanamicina interactúa con el complejo ribosómico 30s e impide la iniciación de la traducción de proteínas. La tetraciclina actúa sobre la misma diana y bloquea la adición de nuevos aminoácidos durante la síntesis del polipéptido. Esta última estrategia funciona bastante bien y tiene una mayor propensión a estabilizar la presencia del vector de expresión en la célula.

[0006] Lamentablemente, estos enfoques de estabilización de vectores de expresión no se pueden utilizar para la producción de proteínas para la terapia humana de acuerdo con los protocolos de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). Por ejemplo, la ampicilina se excluye en estos protocolos debido a problemas de alergenicidad, mientras que para otros antibióticos se requiere la validación para demostrar la eliminación de los antibióticos durante el proceso de purificación⁽²⁾. Otro punto a considerar es la demostración de la estabilidad de la construcción durante el cultivo celular de generación en generación. En consecuencia, son muy deseados sistemas de estabilización de plásmidos distintos a los basados en resistencias a fármacos.

[0007] En la literatura se ha descrito un mecanismo natural de estabilización del plásmido mediante destrucción post-segregacional de las células libres de plásmido mediante el sistema *hok/sok*⁽³⁾. El producto del gen *hok* es una potente proteína de destrucción celular mientras que el gen *sok* codifica un pequeño ARN antisentido complementario con el ARNm de *hok*. Ambos genes están localizados en el plásmido y se transcriben en direcciones opuestas. El ARNm de *hok* es extraordinariamente estable (horas), mientras que el ARN de *sok* decae rápidamente (menos de 30 s). En las células que han perdido el plásmido, el transcrito de ARNm de *hok* permanece estable y su producto destruye a la célula por despolarización de la membrana en ausencia del ARN de *sok* inestable (4).

[0008] La pérdida natural del plásmido en ausencia de presión selectiva es difícil de reducir al mínimo y, por lo tanto, se requiere un nuevo sistema de estabilización del vector no basado en la presión selectiva de un antibiótico que sea compatible con las BPF.

[0009] La estabilidad del vector de expresión es una cuestión importante cuando la producción de proteína recombinante se lleva a cabo en un hospedador procariota, tal como *Escherichia coli*, donde los plásmidos permanecen episómicos y, por lo tanto, tienen un mecanismo de segregación independiente en comparación con el cromosoma bacteriano. Se necesitan vectores de expresión estables, ya que el rendimiento global de la producción de proteína recombinante dependerá de la presencia del plásmido, lo que a su vez es dependiente de la capacidad del microorganismo para mantenerlo (carga metabólica). A nivel de laboratorio, el problema de la pérdida del plásmido se puede evitar mediante la adición de un antibiótico en el medio de cultivo, lo que obligará a las bacterias a mantener el plásmido que codifica la resistencia al antibiótico y, por consiguiente, el gen de interés. Por el contrario, cuando la producción de proteínas para uso humano tiene que ser llevada a cabo de acuerdo con la BPF, la presencia de un antibiótico en el medio de cultivo no es aceptable. Sin embargo, con el fin de iniciar el cultivo con una población homogénea, es absolutamente necesaria una presión selectiva para aislar las bacterias que lleva el plásmido. Por otra parte, durante el cultivo celular, la presión selectiva impedirá el crecimiento de células sin plásmido, las cuales sólo producen proteínas del hospedador y pueden ser considerados como "contaminantes" no deseados. Hasta ahora se ha venido utilizando la selección con antibióticos durante la producción de bancos de células maestro y de trabajo, aunque a partir de una población homogénea, el antibiótico se omitía durante el cultivo celular, permitiendo de este modo la pérdida del plásmido. Por lo tanto, sería conveniente desarrollar un sistema, no basado en la resistencia a los antibióticos para mantener una presión selectiva durante todo el proceso.

[0010] El ámbito de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier dato que no se incluya en las reivindicaciones, se proporciona sólo a título informativo.

Descripción detallada de la invención

[0011] En base a las consideraciones anteriores, hemos desarrollado un sistema de selección novedoso adecuado para la producción de acuerdo con las BPF y basado en una pareja hospedador/vector en el que el crecimiento del microorganismo es estrictamente dependiente de la presencia del plásmido en un medio mínimo selectivo. Un medio mínimo es ventajoso para la producción de proteínas para uso humano, ya que no contiene, por ejemplo, fuentes de transmisión de EEB ni OMG. Otra ventaja es la baja tendencia a la formación de espuma de los medios, lo que favorece la velocidad de transferencia de oxígeno y la posibilidad de imponer la fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo. Dado que el metabolismo de *Escherichia coli* está perfectamente caracterizado, hay disponibles numerosas cepas y, entre estas, se puede elegir la mejor cepa para este experimento de complementación teniendo en cuenta la fuente de carbono disponible o deseada.

[0012] En un primer intento se identificó la enzima β -galactosidasa como el candidato de elección para la construcción de un dúo de complementación hospedador/vector sencillo. Esta enzima clave en el metabolismo de la lactosa hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa, las cuales a su vez se metabolizan. Los residuos de aminoácidos de la porción N-terminal de la β -galactosidasa son responsables de su tetramerización, la cual representa la conformación cuaternaria activa para esta enzima particular. Entre los numerosos mutantes generados a lo largo de los años, la β -galactosidasa M 15 es una forma truncada que presenta una delección de los residuos 11-41. El mutante M 15 es un dímero inactivo pero que se puede complementar a la forma tetramérica activa por la adición del α -péptido lacZ, que contiene los residuos eliminados y que está presente en numerosos vectores de clonación^(11; 12). Esta complementación se ha utilizado durante años para la clonación pero, para nunca para ejercer una presión selectiva sobre el crecimiento de la cepa XL1 de *Escherichia coli* y para forzarla a mantener un plásmido. Para demostrar esto, la cepa XL1 y XL1::pUC19 se colocaron en medio mínimo con lactosa como fuente de carbono. La cepa mutada XL1 que solo carece de actividad β -galactosidasa era incapaz de crecer debido a su incapacidad para metabolizar la lactosa, que era la única fuente de carbono presente en la placa. Cuando se complementaba en trans por el α -péptido lacZ codificado por el plásmido pUC19 comercial, o cuando se sembraba en un medio mínimo con otra fuente de carbono (tal como glucosa) era posible restaurar el crecimiento de la cepa XL1. Este método original y simple permite seleccionar a las células portadoras del plásmido de una manera muy sencilla y sin adición de ningún componente adicional al medio de cultivo. Dado que el crecimiento de la cepa XL1-Blue está limitado sólo cuando la lactosa es la única fuente de carbono disponible, es posible preparar células competentes de la forma clásica usando el medio LB estándar. Una vez más, los transformantes pueden ser seleccionados sembrándolos en medio mínimo con lactosa como única fuente de carbono.

[0013] Esta pareja de hospedador/vector de autoselección es un sistema muy atractivo para la producción de acuerdo con las BPF de proteínas recombinantes en microorganismos donde rutinariamente se utilizan medios sintéticos.

[0014] Dado que la asimilación de la lactosa puede no ser la fuente de carbono más conveniente para aplicaciones industriales, se ha desarrollado un dúo de complementación génica hospedador/vector de expresión diferente con el fin de permitir el uso de cualquier fuente de carbono adecuada. Entonces, se consideró el gen *pyrC* de *Escherichia coli* para el desarrollo de un nuevo sistema de complementación hospedador/vector. El gen y su promotor se

amplificaron por PCR a partir del cromosoma bacteriano y se clonaron en un vector de expresión. Este gen está regulado negativamente por la disponibilidad de pirimidina en el citoplasma de la bacteria mediante la formación de una horquilla en el extremo 5' del transcrito *pyrC*, el cual se solapa con el sitio de unión a ribosomas de *pyrC* y que es necesario para la represión de la expresión de *pyrC*. La formación de la horquilla depende de la concentración intracelular de CTP y GTP. En condiciones de limitación de pirimidina, los transcritos de *pyrC* se traducen fácilmente, dando como resultado un alto nivel de síntesis de dihidroorotasa (13).

[0015] Esta estrecha regulación génica es una ventaja desde el punto de vista energético y ayuda a mantener la carga metabólica celular a niveles lo más bajos posibles, evitando la traducción cuando sea innecesaria.

[0016] El gen *pyrC* también fue seleccionado por estar presente en el cromosoma de *Escherichia coli* como un gen aislado y no como parte de un operón, al contrario de lo que sucede con la mayoría de los genes implicados en la síntesis de pirimidina⁽¹⁴⁾. Otro posible candidato fue el gen *pyrD* pero dado que la ubicación de la proteína codificada está en la membrana⁽¹⁵⁾, su sobre-expresión habría sido perjudicial para los fines de la presente invención. Los datos sobre la estabilización del plásmido con la complementación del gen *pyrC* han demostrado que es posible obtener resultados casi equivalentes, e incluso mejores, con el sistema de la presente invención en comparación con el sistema de resistencia a los antibióticos clásico. Esto es en parte debido a la presión selectiva continua que se aplica a la cepa tan pronto como crece en un medio mínimo donde tiene que sintetizar sus bases pirimídicas. Dado que el sistema actúa sobre la síntesis de ADN/ARN, el metabolismo celular se bloquea cuando la célula de *Escherichia coli* mutada pierde el vector de expresión. Este sistema es muy diferente al procedimiento de estabilización *hok/sok* descrito anteriormente, donde ambos genes están codificados por el plásmido y el cual introduce, en las células libres de plásmido, el producto del gen *hok* correspondiente a una potente proteína de destrucción celular.

[0017] El sistema *pyrC* es una complementación trans de un gen natural de *Escherichia coli* que ha sido eliminado del cromosoma bacteriano y que se ha clonado en el plásmido, y que cuando se pierde introducirá una auxotrofia a la cepa y la posterior detención del crecimiento. Este sistema es diferente al descrito por Fiedler y Skerra⁽¹⁶⁾ que es un sistema de complementación auxotrófico basado en la síntesis del aminoácido prolina. Este tipo de complementación es utilizado por los autores como un segundo mecanismo de selección, junto con la resistencia a cloranfenicol, con el fin de abolir la pérdida del plásmido y para producir una cepa de *Escherichia coli* JM83. Los genes *proAB* no se eliminaron deliberadamente de la cepa, ya que la cepa ya llevaba la mutación (como sucede con muchas cepas de *Escherichia coli*) y estos genes clonados cuando se clonaban en el vector de expresión permitían a la cepa crecer en un medio sintético. No se ha demostrado, sin embargo, que este sistema pueda ser utilizado solo para evitar la pérdida del plásmido durante la fermentación. Esto es probablemente debido al hecho de que la auxotrofia de prolina por sí sola no sea suficientemente selectiva durante la fermentación, ya que el microorganismo puede encontrar algo de prolina en el caldo de cultivo donde las proteínas se acumulan después de transcurrido un tiempo. Este tipo de regulación bloquea la síntesis de proteínas, mientras que *pyrC* afecta la síntesis de ARN o ADN que es un evento más temprano en el metabolismo de la célula. Pero incluso en la presencia de cloranfenicol como el principal agente selectivo, la producción global no excede los 20 mg l⁻¹, valor que es menor que el del sistema de la presente invención.

[0018] Degryse ha descrito un sistema de complementación basado de nuevo en la auxotrofia de un aminoácido (lisina). El autor ha complementado una cepa de *Escherichia coli* deficiente en diaminopimelato (DAP) que es el precursor metabólico de la lisina y de la pared celular bacteriana⁽¹⁷⁾. Una vez más se utilizó el sistema de complementación en paralelo con el gen *cer*, el cual se ha visto que reduce la formación de multímeros y aumenta la estabilidad del plásmido⁽¹⁸⁾. El gen *cer* tiene un mejor efecto estabilizante que la propia complementación de auxotrofia. Aunque el autor ha estabilizado el vector de expresión, admiten que, paradójicamente, no se puede detectar ningún aumento en el nivel de expresión de la proteína recombinante.

[0019] Se han descrito otros sistemas de complementación génica que necesitan ser expresados a partir de un número elevado de copias del plásmido^(19; 28). Estos sistemas son difíciles de usar en un proceso de fermentación donde un elevado número de copias del vector inducen un estrés metabólico demasiado alto para la cepa bacteriana que inevitablemente conduce a la lisis celular.

[0020] Así, en el primer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína recombinante que comprende:

- (a) transformar *E. coli* que carece del gen que codifica *pyrC* con un vector que comprende un gen que codifica la proteína recombinante y el gen *pyrC* de *E. coli* de tipo silvestre y
- (b) cultivar dicha *E. coli* en condiciones de limitación de pirimidina. La célula hospedadora es *Escherichia coli* y la enzima es *PyrC*, la cual está presente en la célula hospedadora de tipo silvestre como un solo gen y no como parte de un operón.

[0021] El método se utiliza preferiblemente para producir proteínas humanas, en particular anticuerpos o fragmentos de los mismos, preferiblemente fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y fragmentos Fv. Los fragmentos Fv se pueden modificar para producir una construcción sintética conocida como una

molécula de cadena única Fv (scFv). Esto incluye un conector peptídico que une covalentemente las regiones V_H y V_L, lo que contribuye a la estabilidad de la molécula. Otras construcciones sintéticas que se pueden usar incluyen péptidos CDR. Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión al antígeno. También se pueden usar péptidos miméticos. Estas moléculas son normalmente anillos orgánicos restringidos conformacionalmente que imitan la estructura de un bucle CDR y que incluyen cadenas laterales que interaccionan con el antígeno.

[0022] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora de *E. coli* en la cual se ha eliminado el gen que codifica pyrC. En una realización preferida, la célula hospedadora es BW 25113[delta]pyrC, que tiene el número de designación CNCMI-3447. En lo sucesivo, la palabra [delta] se puede indicar como el símbolo griego "Δ".

[0023] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre. En una realización preferida, el vector comprende además uno o más promotores, u otros elementos reguladores. Los promotores adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "elemento regulador" significa otros elementos de una secuencia de ácido nucleico que están implicados en la regulación de la expresión génica, tales como secuencias de poliadenilación, elementos potenciadores, terminadores de la transcripción, etc. Las secuencias adecuadas son bien conocidas por la persona experta en la técnica. El vector debería contener también secuencias necesarias para la replicación del vector, por ejemplo, un origen de replicación. El vector contiene preferiblemente un sitio de clonación múltiple.

[0024] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un vector como se define en la presente memoria en un método de expresión de la proteína recombinante.

[0025] En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit para expresar una proteína recombinante que comprende:

- (a) una célula hospedadora de *E. coli* que carece del gen que codifica pyrC y
- (b) un vector, que comprende un gen que codifica una proteína recombinante y el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre.

[0026] La presente invención se describirá ahora en detalle por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

[0027] Se demostró primero que es posible usar la complementación génica como una presión selectiva para forzar a un microorganismo, por ejemplo, *Escherichia coli*, a mantener el vector de expresión durante el crecimiento celular. Para ello, la cepa XL1-blue de *Escherichia coli* ⁽⁵⁾ y el vector de expresión pUC 19 ⁽⁶⁾, ambos comercializados, se identificaron como posibles candidatos para realizar el ensayo de complementación génica. La cepa XL1-blue presenta la mutación [delta](lacZ)M15, que corresponde a la delección del "fragmento α" de la enzima β-galactosidasa. El fragmento α está codificado por muchos vectores de clonación, tales como pUC19 y puede restaurar, por complementación del gen, la actividad enzimática β-galactosidasa en una cepa de *Escherichia coli* que presenta la delección cromosómica [delta](lacZ)M15. Una cepa que lleva esta delección aparecerá incolora cuando se cultive en placas de X-gal, pero cuando se produzca la complementación de un péptido, es decir, cuando el plásmido esté presente, la misma cepa desarrollará un fenotipo azul. El vector de clonación pUC19 codifica por un lado para el gen de la β-lactamasa y por otro lado posee sitios de clonación múltiples posicionados en el α-péptido. Estos sitios de clonación múltiples se insertaron a propósito en esta región para facilitar el cribado de los plásmidos que después del ligado deben ser insertados en un fragmento de ADN. La inserción de ADN en el α-péptido destruye su marco de lectura abierto, o plegado, y suprime la actividad β-galactosidasa, lo que conduce a un fenotipo incoloro cuando se cultivan en placas de X-gal.

[0028] La β-galactosidasa hidroliza la lactosa en glucosa y β-galactosa y es una de las enzimas clave en la vía de asimilación de la lactosa. Para probar la hipótesis, las bacterias de la cepa XL1-blue se transformaron con pUC19 y las células se sembraron en agar LB/ampicilina.

[0029] Los clones seleccionados, todos los cuales contenían el vector de expresión, se transfirieron a continuación a placas mínimas M9 que contenían glucosa o lactosa como fuente de carbono. En paralelo, la cepa no transformada se ensayó para determinar su crecimiento en el mismo medio (Tabla I).

Tabla I: Interdependencia entre la actividad β-galactosidasa y el crecimiento celular			
Crecimiento en medio selectivo			
Cepa/plásmido I	LB / Amp	M9 / glucosa	M9 / Lactosa
XL1-blue	-	+	-
XL1-blue/pUC 19	+	+	+

[0030] Como se muestra en la Tabla I, solamente las células que albergan el vector de expresión son capaces de metabolizar la lactosa y, por lo tanto, de crecer cuando esta es la única fuente de carbono disponible. Este experimento muestra que la complementación de genes entre el plásmido y el hospedador para una enzima metabólica crítica puede ser utilizada con éxito como presión selectiva para forzar a las células a mantener el vector de expresión. Este sistema simple no requiere ninguna adición de antibióticos al medio para seleccionar las células que albergan el plásmido y sólo está limitado por el uso de un medio definido con lactosa como fuente de carbono.

Ejemplo 2

[0031] Habiendo demostrado que el enfoque es correcto, se diseñó un sistema más apropiado para la producción de proteínas recombinantes. Se identificó una enzima clave en el metabolismo de *Escherichia coli* como aquella cuya ausencia impide el crecimiento en medio mínimo, pero no en medios ricos: la enzima dihidroorotasa⁽⁷⁾ que es el producto del gen *pyrC*.

[0032] La dihidroorotasa convierte el dihidroorotato en orotato, el cual se transforma después en orotidilato, que da, después de la descarboxilación el uridilato o UMP, el nucleótido pirimídico esencial. Después de la fosforilación, el UMP se convierte en UTP que a su vez proporciona CTP a la célula. Por lo tanto mediante la supresión de esta enzima es posible bloquear la síntesis de ARN y ADN en sus primeras etapas. En medios complejos CTP y UTP ya están presentes en el caldo de cultivo, por lo que la ausencia de dihidroorotasa no tiene efecto sobre el crecimiento de microorganismos en medios ricos mientras que impide el crecimiento de la cepa en medios mínimos.

[0033] El gen *pyrC* se eliminó por completo del cromosoma⁽⁸⁾ de la cepa BW25113 de *Escherichia coli* para evitar la posible recombinación homóloga con un vector de expresión que lo lleva. La nueva cepa de *Escherichia coli*, BW25113Δ*pyrC*, fue depositada antes de la presentación de la presente solicitud en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, París, de acuerdo con el Tratado de Budapest y lleva la siguiente designación: CNCM I- 3447.

[0034] En paralelo, el gen *pyrC* completo con su propio promotor se amplificaron por PCR y se clonó en pUC18 para generar pUC18-*pyrC*. Como una primera aproximación, y con el fin de validar el sistema de complementación, el pUC 18-*pyrC* se transformó en la cepa BW25113Δ*pyrC* y las colonias resultantes se sembraron en varios medios selectivos (Tabla II).

Tabla II Interdependencia entre la presencia de <i>pyrC</i> y crecimiento de la cepa BW25113Δ <i>pyrC</i> en medio mínimo			
Medio (+ kanamicina)	BW25113Δ <i>pyrC</i>	BW 25113Δ <i>pyrC</i> /pUC18- <i>pyrC</i>	
		+Amp	-Amp
M9 + glucosa	-	+	+
M9 + arabinosa	-	-	-
LB	++	++	++

[0035] Los signos + o - reflejan la capacidad del microorganismo para extenderse en ese medio. La falta de crecimiento con la fuente de carbono arabinosa se debe a la mutación AaraBADAH33 de la cepa (ver Material y Métodos). La resistencia a la kanamicina de la cepa es debida a la inserción del gen de resistencia a la kanamicina en el cromosoma de *Escherichia coli* en el locus *pyrC*. El signo ++ se refiere a un crecimiento superior al de +.

[0036] Estos resultados confirman i) que la cepa BW25113[delta]*pyrC* por sí sola no es capaz de crecer en medio mínimo si no se complementa con el gen *pyrC*; ii) la funcionalidad del gen *pyrC* clonado y su eliminación correcta en la cepa bacteriana; iii) la incapacidad de esta cepa para utilizar arabinosa como fuente de carbono, que es un parámetro importante para la expresión génica a partir del promotor de arabinosa (ver más abajo).

Ejemplo 3

[0037] A fin de comprobar la estabilidad del plásmido, las diluciones de un cultivo durante la noche, en medio mínimo, se sembraron en agar LB y, al día siguiente, algunas ufc se transfirieron a medio mínimo M9/glucosa con o sin ampicilina (Tabla III).

Tabla III: Estabilidad del plásmido después de cultivo durante la noche. Después de cultivo durante la noche, las células se diluyeron hasta la densidad apropiada y se sembraron en agar LB. A continuación se transfirieron 40 ufc a un medio selectivo para determinar la presencia del plásmido	
Medio	% de células que poseen el plásmido
M9 + glucosa + Amp	100
M9 + glucosa	100

[0038] Este experimento demuestra que el plásmido estaba presente en todas las células ensayadas, incluso después de un cultivo durante la noche, puesto que las ufc presentes en la placa de LB son todavía capaces de crecer en medio mínimo.

5 **[0039]** A continuación se determinó si el sistema de estabilización basado en *pyrC* investigado todavía sería eficiente, incluso en la presencia de una carga metabólica alta del microorganismo, tal como la que existe durante la producción de una proteína recombinante, lo que normalmente estimula la cepa a desechar el vector de expresión. Para ello, se utilizó como plásmido de referencia DoB 0114 (Figura 1), un vector de expresión derivado de pBAD (Invitrogene™), en el que el gen *bla* fue sustituido por uno de resistencia a la tetraciclina. Este vector de expresión
10 bi-cistrónico diseñado internamente fue diseñado para expresar el fragmento Fab humano C4⁽⁹⁾ en el espacio periplásmico de *Escherichia coli*. Puesto que el fragmento Fab es una proteína pequeña y soluble, se difunde desde el espacio periplásmico de *E. coli* hasta el sobrenadante de cultivo donde se recoge y purifica fácilmente.

[0040] DoB 0138 (Fig 2) fue derivado de DoB 0114 mediante la sustitución del gen de resistencia a antibióticos con *pyrC*. Los vectores de expresión DoB 0114 y DOB 0138 fueron, respectivamente, transformados en una cepa W3110 ara⁻⁽¹⁰⁾ y en una cepa BW25113[delta]*pyrC*. Después de la transformación, con el fin de seleccionar una ufc que llevase el vector de expresión para inocular el cultivo, W3110::DoB 0114 se sembró en agar LB/tetraciclina, mientras que BW25113[delta]*pyrC*::DoB 0138 se sembró en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono. Se utilizó una única ufc para inocular un cultivo en matraz de 10 ml con agitación en medio mínimo suplementado
20 con un azúcar como fuente de carbono (y tetraciclina para DoB 0114). Después de 15 horas a 30 °C se utilizaron los 10 ml para inocular 90 ml, del mismo caldo, y se incubaron durante 13 horas a 37 °C. Se utilizó un matraz de cultivo de 100 ml con agitación para inocular un fermentador de 1 litro. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 10-12, se determinó el porcentaje de células portadoras de plásmido y se activó la producción de proteína recombinante mediante la adición de 5 gramos de arabinosa (T₀). Después de 16 horas de inducción cuando la DO₆₀₀ alcanzó 30 (T₁₆), la
25 fermentación se detuvo y se determinaron la cantidad de fragmentos Fab y proteínas recombinantes en el sobrenadante del cultivo (Tabla IV).

Tabla IV: Determinación del porcentaje de células transformadas y rendimiento de la proteína recombinante relacionada				
DoB	Selección	% de células transformadas (T ₀)	Concentración de proteína en T ₁₆ (mg/l)	
			Fab	Total
0114	Tetraciclina*	96	1,8	464 ± 133
0138	PyrC	98	6,6	614 ± 95

La concentración de Fab se determinó mediante RP-HPLC mientras que la concentración total de proteína se evaluó mediante el análisis de Bradford.

*La tetraciclina se añadió solo al inóculo del cultivo y no durante la fermentación.

30 **[0041]** Los resultados de este experimento demuestran que, aunque en el momento de la inducción, el número de células transformadas es equivalente para ambos vectores, al final del cultivo el rendimiento de producción global de DoB 0138 es sorprendentemente más de tres veces que el de DoB 0114, mientras que la concentración de proteína total presente en el sobrenadante del cultivo permanece casi inalterada. Estos resultados pueden explicarse por una mayor estabilidad del plásmido DoB 0138 en comparación con DoB 0114 durante la fase de inducción del cultivo. El porcentaje de células transformadas se determinó como se ha descrito anteriormente: las células se sembraron
35 primero en agar LB y luego se transfirieron a medios selectivos (agar LB + tet para DoB 0114 o M9 glucosa para DoB 0138). Si estos métodos no funcionan perfectamente antes de la inducción, la elevada carga metabólica del microorganismo inducido ralentiza su crecimiento de forma tan dramática que resulta casi imposible observar cualquier formación de colonias en las placas. Esta hipótesis fue confirmada sembrando una ufc no inducida de una placa de LB, en una placa M9 y M9/arabinosa. Cualquier crecimiento observado en el medio mínimo M9 es incapaz
40 de prosperar en M9/arabinosa. Este crecimiento lento extremo, atribuible a cargas metabólicas elevadas del microorganismo inducido, impide el aislamiento de células individuales con el fin de determinar el porcentaje de mantenimiento del vector durante la fase de inducción.

Ejemplo 4

45 **[0042]** Habiendo demostrado que el sistema de estabilización por complementación génica daba mejores resultados que el sistema clásico, se llevó a cabo una fermentación a escala de diez litros incluyendo esta vez un sistema de alimentación por lotes para investigar el método de escalabilidad. La concentración del sustrato se aumentó hasta 60 g/l y el fermentador (comenzando con 7,2 litros) se inoculó con 800 ml de precultivo. Después de un periodo de
50 proceso por lotes de aproximadamente 17 horas, se inició la alimentación con una solución de azúcar como fuente de carbono y arabinosa como inductor. El control de alimentación por lotes se fijó en el valor de oxígeno disuelto (OD) que activaba la bomba de alimentación cuando se superaba el valor del 50 %. Después de 20 horas de alimentación por lotes, la DO₆₀₀ del cultivo alcanzó 150-160 y se cosechó el sobrenadante que contiene el Fab

(Tabla V).

Tabla V: Determinación del porcentaje de células portadoras del plásmido y rendimiento de la proteína recombinante relacionada después de la fermentación por lote alimentado				
DoB	Selección	% de células transformadas (T ₀)	Concentración de proteína en T ₂₀ (mg/l)	
			Fab	Total
0114	Tet	100	40,2	1884 ± 180
0138	PyrC	100	84,6	1202 ± 130

[0043] Estos resultados demuestran la escalabilidad del método y que incluso después de un mayor número de generaciones la estabilidad vector de expresión todavía seguía cumpliendo las expectativas. Esta vez, debido al sistema por lote alimentado, el rendimiento global de Fab fue diez veces superior al del cultivo en 1 litro, aunque el sistema de complementación con PyrC sigue produciendo el doble de la cantidad del vector “clásico” DoB 0114.

Ejemplo 5

[0044] Con el fin de demostrar que las diferencias observadas en el rendimiento de la producción de Fab no eran dependientes de la cepa (es decir W3110 frente a BW25113), se planificó un experimento final en el que los dos vectores de expresión se transformaron en BW25113. El protocolo de fermentación se modificó ligeramente y la fase de inducción se amplió durante 6 horas adicionales.

[0045] Al final de la fermentación el sobrenadante se acidificó a pH 6 y se pasó a través de una columna de flujo rápido SP-Sepharose (Amersham Biosciences). Debido al elevado punto isoeléctrico de Fab, en esas condiciones y a este pH, Fab es casi la única proteína que se va retener en la resina y eluir en el primer pico, donde representa más del 80 % de las proteínas. Después de la adsorción y el lavado de la resina, se eluyó y se cosechó la fracción correspondiente a Fab. El resultado del experimento se describe en la figura 3. La producción global de Fab se estimó en alrededor de 100 mg por litro para el sistema PyrC (DoB 0138-línea continua) y para el vector de expresión estabilizado con TET (DoB 0114-línea discontinua) se obtuvo un rendimiento inferior al 50 %.

[0046] Durante la fermentación se observó un crecimiento más rápido para DoB 0114 que consumió los dos litros de solución de alimentación después de 22 horas de inducción, mientras que en el mismo tiempo DoB 0138 sólo consumió 1,35 litros. Esta rápida tasa de crecimiento se correlaciona bien con el menor rendimiento metabólico del microorganismo, la relativamente baja producción de proteína recombinante y la alta producción de proteínas de la célula hospedadora. De hecho, con DoB 0114, Fab representa un porcentaje mucho menor respecto a las proteínas presentes en el sobrenadante en comparación con el DoB 0138. En el segundo caso, que tiene un mayor rendimiento global de proteína recombinante, se obtiene material más fácil de purificar, ya que la proteína recombinante, que se puede estimar que es el 10 % de la proteína soluble, ya es 10 % “pura”.

[0047] Dado que la única diferencia entre los dos sistema es la presión selectiva que es continua en el caso de pyrC, hemos establecido un protocolo de PCR con el fin de verificar la presencia del vector de expresión durante la fermentación. Se usó un par de cebadores correspondientes a la parte carboxilo terminal de la cadena pesada de Fab para amplificar por PCR el vector de expresión directamente del caldo de cultivo oportunamente normalizado a una DO_{600nm} de 0,1 para compensar la multiplicación celular (y por lo tanto el molde). Como se muestra en la Figura 4, la señal correspondiente a DoB 0138 es estable durante el tiempo de fermentación, mientras que para DoB 0114 disminuye hasta convertirse en una banda imperceptible débil después de 26 horas de inducción.

Material y Métodos

Medio

[0048] Sales minerales componentes del medio junto con agua se trataron en autoclave a 121 °C durante 20 min in situ. El azúcar inicial fue esterilizado por separado por filtración a 0,22 µm y se añadió al biorreactor dando una concentración de 40,0 g/l para crear una fase de lote pequeño antes de iniciar la fase de alimentación. Se añadieron diez mililitros de solución de oligoelementos y vitaminas por filtración estéril al biorreactor ya estéril. La composición de la solución de oligoelementos fue (g por litro): C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, 100,0; I CaCl₂*2H₂O, 3,40; ZnSO₄*7H₂O, 2,40; MnSO₄*2H₂O, 1,50; CuSO₄*5H₂O, 0,50; CoCl₂*6H₂O; FeCl₃*6H₂O, 9,70; H₃BO₃, 0,03; Na₂MoO₄*2H₂O, 0,02; KCl, 74,5. La alimentación contenía solución de azúcar 70 %. La composición de la solución de inducción de alimentación era: 70 % de azúcar; vitaminas y arabinosa. Cuando era necesario para controlar la espuma se añadió antiespumante 204.

Cultivo

[0049] Se preparó un cultivo primario de siembra haciendo crecer células en un matraz de 100 ml con agitación que contenía 25 ml de medio de biorreactor a excepción de la concentración de azúcar de 5,0 g/l. Este cultivo se hizo crecer a 37 °C y a 245 rpm durante 15 h. Se utilizó 16 ml de cultivo primario de siembra como inóculo para un matraz con deflector de 2 litros que contenía 400 ml del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones. El cultivo secundario de siembra se transfirió a un biorreactor CF 3000 (Chemap) 15-1 con un volumen de trabajo de 10 l. El fermentador estaba equipado con un rociador de aire y el flujo de aire se fijó inicialmente en 8 l/min y se elevó gradualmente hasta 10 l/min una vez iniciada la alimentación. La velocidad del agitador se incrementó de 800 a 1200 rpm durante el período por lotes y se redujo hasta 1.000 rpm durante la parte de lote alimentado. Se utilizó un electrodo de oxígeno polarográfico para registrar el oxígeno disuelto (OD). El fermentador estaba equipado con valoración del pH para mantener un pH de 6,95 mediante la adición de una solución de amoníaco al 30 % (p/p). La temperatura se controló a 37 °C. La alimentación se inició cuando la DO aumentó después del agotamiento del azúcar inicialmente añadido. Durante la primera fase de lote alimentado se añadieron 230 ml de solución de alimentación de azúcar mediante un control DO-STAT con el punto de ajuste de la concentración de oxígeno fijado a una saturación del 50 %. La fase de expresión de la proteína se inició cambiando a la solución de alimentación que contiene arabinosa como el inductor, manteniendo la misma estrategia para DO-STAT durante 30 h.

Muestreo

[0050] El muestreo se llevó a cabo cada hora a lo largo en todos los cultivos.

Análisis

[0051] Medición de la concentración de proteína: La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de proteínas de Bio-Rad. El ensayo se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron cantidades crecientes (de 0,25 a 8 µg por pocillo) de BSA para crear una curva estándar de concentración de proteína de referencia. En cada pocillo se mezcló 50 µl de solución de tinción con 150 µl de muestra, a continuación se leyó la A₅₉₅ en un lector de microplacas modelo 450 (Bio-Rad).

[0052] Las muestras de expresión de proteína recombinante (electroforesis en gel y transferencia Western) se sometieron a SDS-PAGE al 15 % no reductor de acuerdo con Laemmli (21), con una modificación menor, en un aparato Mini-Protean II (Bio-Rad). En algunos experimentos, los geles se procesaron en condiciones reductoras. Se usaron estándares de peso molecular amplio (Bio-Rad) para determinar el peso molecular aparente de las bandas electroforéticas. Se procesaron minigeles de 1,0 mm de espesor a 50 mA durante 1 h, se tiñeron durante la noche en una solución de Phast Gel Blue R (Pharmacia) 0,02 % preparada en CH₃OH 40 %, CH₃COOH 10 %, eliminándose la tinción en CH₃OH 20 % y CH₃COOH 5 %.

[0053] El análisis de transferencia Western se realizó de acuerdo con Towbin et al. (22), con una modificación menor. Las muestras analizadas en SDS-PAGE 15 % se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm a 1 mA /cm² durante 90 min en un aparato Multiphor II semiseco (Pharmacia). Las membranas se tiñeron con una solución Ponceau S (Sigma, EE.UU.). Los correspondientes estándares de peso molecular fueron marcados y la eliminación completa de la tinción se consiguió mediante lavado en Tris-HCl 20 mM, pH 7,40, NaCl 150 mM (TBS). Las membranas se saturaron durante la noche con una solución de BSA al 2 % en TBS (BT), a continuación, se incubaron durante 1 h con una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda de conejo conjugado con peroxidasa (DAKO) en BT que contiene Tween 20 0,05 % (BTT). A continuación, la membrana se lavó una vez durante 10 min con BTT, una vez con Tween 20 0,25 % en TBS y varias veces en TBS. Todas las incubaciones se realizaron en una plataforma de agitación a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló mediante el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Fico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Análisis por HPLC

[0054] La cuantificación de Fab soluble en el caldo de fermentación se llevó a cabo, después de una etapa de clarificación realizada por centrifugación a 17000xg durante 15 minutos por HPLC equipada con una columna VYDAC Diphenyl 219TP54, 250 x 4,6 mm DI de 300 Å y un detector de fluorescencia (ex λ: 285 nm; em λ = 360 nm; ganancia 1000). Además se analizaron en las mismas alícuotas de sobrenadante el azúcar, el acetato y la arabinosa por HPLC equipado con una columna PL Hi-Plex H 8 µm, 300 x 7,7 mm, 8 µm o columna equivalente y un detector del índice de refracción.

Biología molecular**Construcción de la cepa de *Escherichia coli* BW25113, ΔpyrC.**

[0055] Se produjo el mutante pyrC de acuerdo con Datsenko y Wanner, que permite delecciones definidas en el cromosoma de *Escherichia coli*. El seleccionado fue BW25113 (*lacI^f*, *rrnB_{T14}*, *ΔlacZ_{WJ16}*, *hsdR514*, *ΔaraBA-DAH33*, *ΔrhaBAD_{LD78}*). Se eliminó el gen completo con su propio promotor para evitar la recombinación homóloga con la

copia del plásmido. Los cebadores utilizados para eliminar el gen fueron:

dispyrC-f: **SEC ID N.º 1**: 5'-AATTGTCATT CCATTTACTG ATTAATCACG AGGGCGCATT GTGTAGGCTG
GAGCTGCTTC-3' y

dispyrC-r: **SEQ ID N.º 2**: 5'-ACAGGTAAAA TAACCTAATG ACAACAGGAA GCTACGATTT ATTCCGGGGA
TCCGTCGACC-3'.

[0056] El gen de resistencia a la kanamicina no se eliminó del cromosoma de la cepa para que pudiera servir como posible selección positiva para la propia cepa.

PUC18-pyrC:

[0057] El gen pyrC se recuperó por PCR del cromosoma de *Escherichia coli* utilizando los siguientes cebadores:

pyrC-fwd: **SEC. ID. N.º: 3**: 5'-ATATACCATG GCGCGCCCTT TATTTTCGT GC-3';

pyrC-rev: **SEC. ID. N.º: 4**: 5'-GTT AACCA TG GTT A TTGTTT AACGGACCAG CGT AC-3' y se clonó en el sitio SmaI de pUC18 y el vector resultante se denominó pUC-pyrC.

Construcción de DoB 0114:

[0058] El vector DoB 0114 se obtuvo a partir del vector pBAD/Myc-His A, B, C (Invitrogen) por sustitución del gen de la ampicilina por uno de la tetraciclina de pBR322. El cassette de expresión C4 se ensambló con los siguientes oligonucleótidos y el vector de expresión pHEN1⁽⁹⁾ como molde:

"PIC4" **SEC. ID. N.º: 5**: 5'-AAA AAA AAC ATC GCA TTC CTG CTG GCA TCT ATG TTC GTT TTC TCT ATC
GCA ACC AAC GCA TAC GCA CAG TCT GCC CTG ACT CAG GCT-3';

"P2 C4" **SEC. ID. N.º: 6**: 5'-GGT TAA TTT CTC CTT CTA TGA ACA TTC TGT AGG GG -3' ;

"P3 C4" **SEC. ID. N.º: 7**: 5'-TCA TAG AAG GAG AAA TTA ACC ATG AAA AAA AAC ATC GCT TTC CTG CTG
GCT TCC ATG TTC GTT TTC TCC A TC GCT ACC AAC GCT T AC GCT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT-
3 ;

"P4 C4" **SEC. ID. N.º 8**: 5'-TCA GGA GGT TTT GTC GCA GGA TTT GGG CTC AAC T-3' ;

"P5 C4" **SEC. ID. N.º :9**: 5'-AAA AAA AAC ATC GCA TTC CTG CTG GCA-3',

"P6 C4" **SEC. ID. N.º 10**: 5'-CCC GCT CGA GTC AGG AGG TTT TGT CGC AGG A-3'.

[0059] Los cebadores P1 y P2 se utilizaron en una primera PCR para amplificar la cadena ligera de Fab y añadir en el marco de la secuencia líder StII. Se llevó a cabo una segunda PCR para amplificar por separado la cadena pesada de Fab y añadir la secuencia líder StII y la secuencia intergénica. Dado que las dos secuencias se superponen (ver dibujos), los productos de PCR resultantes de las dos primeras ampliificaciones se mezclaron juntos en una tercera reacción de elongación, durante diez ciclos, durante los cuales no se añadieron cebadores. Después de la etapa de elongación, se añadieron los cebadores P5 y P6 a la PCR y el cassette de expresión de longitud completa se amplificó como se muestra en la figura 5.

[0060] El producto final de PCR se digirió con la enzima de restricción XhoI y se clonó en el vector pBAD abierto con NcoI (Klenow) XhoI. Las ufc fueron seleccionadas por PCR y se secuenció un clon positivo para el cassette de expresión entero de Fab. Un clon que presenta la secuencia esperada se denominó DoB 0114 (Figura 1).

Construcción de DoB 0138:

[0061] Este vector de expresión se obtuvo mediante la sustitución del fragmento de ADN HindIII-NruI de DoB 0114, que codifica la resistencia a la tetraciclina, con el gen pyrC obtenido por digestión con EcoRI/Klenow-HindIII del plásmido pUC-pyrC (Figura 2).

Detección por PCR del vector de expresión

[0062] Para detectar/amplificar el vector de expresión se llevó a cabo una PCR en una muestra de caldo de cultivo diluido a DO_{600nm} 0,1 con el fin de normalizar el número de células. Los ciclos de PCR se establecieron como se indica en la siguiente tabla.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	94 °C	4 min.	1
2	94 °C	1 min.	30
3	60 °C	1 min.	
4	72 °C	1 min.	
5	72 °C	10 min.	1

Cebadores:5 **[0063]**

247 CH sentido PCN 5' **SEC ID N.º :11:** -GGAGTGGGTCTCATCCATT- 3' Tm = 61,4

248 CH AS PCN5' **SEC ID N.º :12:** - GACCTTGGTGTGCTGGG - 3' Tm = 64,3

10 El producto de PCR es de aproximadamente 500 pb para la cadena pesada de Fab.

[0064] El sistema de expresión de la presente invención permite una rápida selección de células que contienen el plásmido durante las fases de clonación y que da lugar a una elevada expresión de la proteína durante la fermentación. Este sistema tiene una gran eficiencia selectiva, especialmente durante la fase de inducción, permitiendo la selección de una población de células que contienen el plásmido casi homogénea. Además, la productividad del cultivo es en gran medida mayor que uno basado en la resistencia a antibióticos. Esta gran estabilidad del vector combinado con su alta productividad cumple los requisitos para la producción de proteína heteróloga en *Escherichia coli* a nivel industrial. Se ha demostrado además que la cepa diseñada era una cepa mejor para la producción de Fab que la clásica W3110 y que su derivado pyrC era adecuado para la fermentación por lote alimentado con alta densidad celular y, por consiguiente, abierto a la explotación industrial.

SEC. ID. N.º: 13: Secuencia del gen PyrC insertado en el vector de clonación pUC18

```

1      ATATACCATG GCGCGCCCTT TATTTTTCGT GCAAAGGAAA ACGTTTCCGC
      TATATGGTAC CGCGCGGGAA ATAAAAAGCA CGTTTCCTTT TGCAAAGGCG

51     TTATCCTTTG TGTCCGGCAA AAACATCCCT TCAGCCGGAG CATAGAGATT
      AATAGGAAAC ACAGGCCGTT TTTGTAGGGA AGTCGGCCTC GTATCTCTAA

      M T A P S Q V L K I R R P D D W H .
101    AATGACTGCA CCATCCCAGG TATTAAAGAT CCGCCGCCCA GACGACTGGC
      TTACTGACGT GGTAGGGTCC ATAATTTCTA GGCGGCGGGT CTGCTGACCG

      . L H L R D G D M L K T V V P Y T
151    ACCTTCACCT CGCGCATGGC GACATGTAA AACTGTCTG GCCATATACC
      TGGAAGTGGA GGCGCTACCG CTGTACAATT TTTGACAGCA CGGTATATGG

      S E I Y G R A I V M P N L A P P V .
201    AGCGAAATTT ATGGACGGGC TATCGTAATG CCCAATCTGG CTCCGCCCGT
      TCGCTTTAAA TACCTGCCCG ATAGCATTAC GGGTTAGACC GAGGCGGGCA

      . T T V E A A V A Y R Q R I L D A V .
251    GACCACCGTT GAGGCTGCCG TGGCGTATCG CCAGCGTATT CTTGACGCCG
      CTGGTGGCAA CTCCGACGGC ACCGCATAGC GGTCGCATAA GAACTGCGGC

      . P A G H D F T P L M T C Y L T D
301    TACCTGCCGG GCACGATTTC ACCCCATTGA TGACCTGTTA TTAAACAGAT
      ATGGACGGCC CGTGCTAAAG TGGGGTAACT ACTGGACAAT AAATTGTCTA

      S L D P N E L E R G F N E G V F T .
351    TCGCTGGATC CTAATGAGCT GGAGCGCGGA TTAAACGAAG GCGTGTTTAC
      AGCGACCTAG GATTACTCGA CCTCGCGCCT AAATTGCTTC CGCACAAGTG

      . A A K L Y P A N A T T N S S H G V .
401    CGCTGCAAAA CTTTACCCGG CAAACGCAAC CACTAACTCC AGCCACGGCG
      GCGACGTTTT GAAATGGGCC GTTTGCGTTG GTGATTGAGG TCGGTGCCCG

      . T S I D A I M P V L E R M E K I
451    TGACGTCAAT TGACGCAATC ATGCCGGTAC TTGAGCGCAT GGAAAAATC
      ACTGCAGTTA ACTGCGTTAG TACGCCCATG AACTCGCGTA CCTTTTTTAG

      G M P L L A H G E V T H A D I D I .
501    GGTATGCCGC TACTGGCGCA TGGTGAAGTG ACACATGCAG ATATCGACAT
      CCATACGGCG ATGACCGCGT ACCACTTCAC TGTGTACGTC TATAGCTGTA

      . F D R E A R F I E S V M E P L R Q .
551    TTTTGATCGT GAAGCGCGCT TTATAGAAAG CGTGATGGAA CCTCTGCGCC
      AAAACTAGCA CTTGCGCGCA AATATCTTTC GCACTACCTT GGAGACGCGG

      . R L T A L K V V F E H I T T K D
601    AGCGCCTGAC TCGCTGAAA GTCGTTTTTG AGCACATCAC CACCAAAGAT
      TCGCGGACTG ACGCGACTTT CAGCAAAAAC TCGTGTAGTG GTGGTTTCTA

      A A D Y V R D G N E R L A A T I T .
651    GCTGCCGACT ATGTCCGTGA CGGAAATGAA CGGCTGGCTG CCACCATCAC
      CGACGGCTGA TACAGGCACT GCCTTTACTT GCCGACCGAC GGTGGTAGTG
  
```

```

      . P Q H L M F N R N H M L V G G V R .
701  TCCGCAGCAT CTGATGTTTA ACCGCAACCA TATGCTGGTT GGAGGCGTGC
      AGGCGTCGTA GACTACAAAT TGGCGTTGGT ATACGACCAA CCTCCGCACG

      . P H L Y C L P I L K R N I H Q Q .
751  GTCCGCACCT GTATTGTCTA CCCATCCTCA AACGTAATAT TCACCAACAG
      CAGGCGTGGA CATAACAGAT GGGTAGGAGT TTGCATTATA AGTGGTTGTC

      A L R E L V A S G F N R V F L G T .
801  GCATTGCGTG AACTGGTCGC CAGCGGTTTT AATCGAGTAT TCCTCGGTAC
      CGTAACGCAC TTGACCAGCG GTCGCCAAAA TTAGCTCATA AGGAGCCATG

      . D S A P H A R H R K E S S C G C A .
851  GGATTCTGCG CCACATGCAC GTCATCGCAA AGAGAGCAGT TGCGGCTGCG
      CCTAAGACGC GGTGTACGTG CAGTAGCGTT TCTCTCGTCA ACGCCGACGC

      . G C F N A P T A L G S Y A T V F
901  CGGGCTGCTT CAACGCCCCA ACCGCGCTGG GCAGTTACGC TACCGTCTTT
      GCCCGACGAA GTTGCGGGGT TGGCGCGACC CGTCAATGCG ATGGCAGAAA

      E E M N A L Q H F E A F C S V N G .
951  GAAGAAATGA ATGCTTTGCA GCACTTTGAA GCATTCTGTT CTGTAAACGG
      CTTCTTTACT TACGAAACGT CGTGAAACTT CGTAAGACAA GACATTTGCC

      . P Q F Y G L P V N D T F I E L V R .
1001 CCCGCAGTTC TATGGGTTGC CGGTCAACGA CACATTCATC GAACTGGTAC
      GGGCGTCAAG ATACCCAACG GCCAGTTGCT GTGTAAGTAG CTTGACCATG

      . E E Q Q V A E S I A L T D D T L
1051 GTGAAGAGCA ACAGGTTGCT GAAAGCATCG CACTGACTGA TGACACGCTG
      CACTTCTCGT TGTCCAACGA CTTTCGTAGC GTGACTGACT ACTGTGCGAC

      V P F L A G E T V R W S V K Q
1101 GTGCCATTCC TCGCCGGGGA AACGGTACGC TGGTCCGTTA AACAATAACC
      CACGGTAAGG AGCGGCCCTT TTGCCATGCG ACCAGGCAAT TTGTTATTGG

1151 ATGGTTAAC
      TACCAATTG

```

Referencias

5 [0065]

1. B. Hoffman; J. A. Broadwater,; P. Johnson; J. Harper; B. G. Fox and W. R. Kenealy. Proto Exp. Punf. 6, 646-654 (1995). Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in Escherichia coli BL21(DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein.
2. Murphy, D.B. and Epstein, S.L. (1998) Guidance for Industry. Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. Food and Drug Administration, Rockville, MD.
3. Gerdes K, Helin K, Christensen OW, Lobner-Olesen A. J Mol Biol 1988 Sep 5;203(1):119-29. Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid RI.
4. Pecota DC, Osapay G, Selsted ME, Wood TK. J Biotechnol 2003 Jan 9;100(1):1-12. Antimicrobial properties of the Escherichia coli RI plasmid host killing peptide.
5. Bullock, W.O., J. M. Fernandez, and J. M. Short. 1987. Xil-Blue, a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta galactosidase selection. Focus 5:376-378.
6. Yanisch-Perron C.; Vieira J and Messing J. Gene. 1985;33(1):103-19. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
7. Backstrom D, Sjoberg RM, Lundberg LG. Eur J Biochem 1986 Oct 1;160(1):77-82 Nucleotide sequence of the structural gene for dihydroorotase of Escherichia coli K12.

8. Datsenko KA, Wanner BL. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jun 6;97(12):6640-5. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.
9. Figini M, Obici L, Mezzanzanica D, Griffiths A, Colnaghi MI, Winter G, Canevari S. Cancer Res. 1998 Mar 1;58(5):991-6. Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection.
10. Duenas M, et al. Biotechniques 1994 Mar; 16(3):476- 7,480-3. Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in E. coli: effect of bacterial strains and pathway engineering using GroES/L chaperonins.
11. Gallagher CN, Huber RE. J Protein Chem 1998 Feb;17(2):131-41 Studies of the M15 beta- galactosidase complementation process.
12. Langley KE, Zabin I. Biochemistry 1976 Nov 2;15(22):4866-75: beta-Galactosidase alpha complementation: properties of the complemented enzyme and mechanism of the complementation reaction.
13. Wilson HR, Archer CD, Liu JK, Turnbough CL Jr. J Bacteriol 1992 Jan;174(2):514-24; Translational control of pyrC expression mediated by nucleotide-sensitive selection of transcriptional start sites in Escherichia coli.
14. Sato T, Ohki M, Yura T, Ito K. J Bacteriol 1979 May;138(2):305-13; Genetic studies of an Escherichia coli K-12 temperature-sensitive mutant defective in membrane protein synthesis.
15. Larsen IN, Jensen KF. Eur J Biochem 1985 Aug 15;151(1):59-65; Nucleotide sequence of the pyrD gene of Escherichia coli and characterization of the flavoprotein dihydroorotate dehydrogenase.
16. Fiedler M, Skerra A. Gene. 2001 Aug 22;274(1-2): 111-8; proBA complementation of an auxotrophic E. coli strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment.
17. Degryse E. J Biotechnol. 1991 Apr;18(1-2):29-39."Stability of a host-vector system based on complementation of an essential gene in Escherichia coli."
18. Summers DK, Sherratt DJ. Cell. 1984 Apr;36(4):1097-103. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability.
19. Porter RD, Black S. J Bacteriol. 1991 Apr;173(8):2720-3. The single-stranded-DNA-binding protein encoded by the Escherichia coli F factor can complement a deletion of the chromosomal ssb gene.
20. Rocky M. Cranenburgh, Julian A. J. Hanak, Steven G. Williams and David J. Sherratt; Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No.5 e26; 2001 Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration.
21. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227,680-685.
22. Towbin, R., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76,4350-4354.
23. EP0972838

LISTADO DE SECUENCIAS

[0066]

- <110> Dompé S. p. A.
- <120> Nuevo sistema de selección
- <130>EPI180
- <160> 13
- <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
- <211>60

ES 2 562 664 T3

<212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 1
 5 *aat t gt cat t ccat t t act g at t aat cacg agggcgcat t gt gt aggct g gagct gct t c* 60

<210>2
 <211>60
 <212> ADN
 10 <213> *Escherichia coli*

<400>2
acagg t aaaa t aacct aat g acaacaggaa gct acgat t t at t ccgggga t ccgt cgacc 60

15 <210> 3
 <211>32
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

20 <400>3
at at accat g gcgcgcct t t at t t t t cgt gc 32

<210>4
 <211>35
 25 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400>4
 30 *gttaaccatg gttattgtt aacggaccag cgtac* 35

<210>5
 <211>87
 <212> ADN
 35 <213> Humano

<400> 5
aaaaaaaaaca t cgcatt cct gctggcatct atgttcgttt tctctatcgc aaccaacgca 60
t acgcacagt ctgccctgac t cagcct 87

40 <210>6
 <211>35
 <212> ADN
 <213> Humano

45 <400>6
ggtaatttc tcctctatg aacattctgt agggg 35

<210> 7
 <211>111
 50 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 7
t cat agaagg agaaattaac catgaaaaaa aacatcgctt t cctgctggc ttccatgttc 60
gttttctcca t cgtaccaa cgcttacgt caggtgcagc tggaggagt c t 111

55 <210> 8
 <211>34
 <212> ADN
 60 <213> Humano

<400>8
t caggaggt t t t gt cgcagg at t t gggct c aact 34

 5 <210> 9
 <211>27
 <212> ADN
 <213> Humano

 10 <400> 9
aaaaaaaaaca t cgcat t cct gct ggca 27

 15 <210> 10
 <211>31
 <212> ADN
 <213> Humano

 20 <400> 10
cccgcctcgag tcaggaggtt t t gt cgcagg a 31

 25 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Humano

 30 <400> 11
ggagt gggc c t cat ccat t 19

 35 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Humano

 40 <400> 12
gaccttggtg ttgctggg 18

 45 <210> 13
 <211> 1159
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 50 <400> 13

at at accatg gcgcgccctt tat ttttcgt gcaaaggaaa acgtttccgc ttatcctttg 60
 t gtcgggcaa aaacatccct tcagccggag catagagatt aatgactgca ccatcccagg 120
 tattaagat ccgccgccca gacgactggc accttcacct ccgcgatggc gacatgttaa 180

 aaactgtcgt gccatatacc agcgaaattt atggacgggc tatcgtaatg cccaatctgg 240
 ctccgccgt gaccaccgtt gaggcggcg tggcgtatcg ccagcgtatt cttagcggcg 300
 tacttgccgg gcacgatitc accccattga tgacctgtta tttaacagat tcgctggatc 360
 ctatgagct ggagcgcgga tttaacgaag gcggtgtcac cgctgcaaaa ctttaccgg 420
 caaacgcaac cactaactcc agccacggcg tgacgtcaat tgacgcaatc atgccggtac 480
 ttgagcgcgt ggaaaaaatc ggtatgccgc tactggcgca tggagaagt acacatgcag 540
 atatcgacat ttttgatcgt gaagcgcgct ttatagaaag cgtgatggaa cctctgcgcc 600
 agcgccctgac tgcgctgaaa gtcgtttttg agcacatcac caccaaagat gctgccgact 660
 atgtccgtga cggaaatgaa cggctggctg ccaccatcac tccgcagcat ctgatgttta 720
 accgcaacca tatgctggtt ggaggcgtgc gtccgcacct gttatgtcta cccatcctca 780
 aacgtaatat taccacacag gcatlccgtg aactggtcgc cagcgggttt aatcgaglat 840
 tccctcggtao ggattctgcg ccacatgcac gtcatacgcaa agagagcagtt gggcgtgcg 900
 cgggctgctt caacgcccca accgcgctgg gcagttacgc taccgtcttt gaagaaatga 960
 atgctttgca gcactttgaa gcatlctgtt ctgtaaacgg cccgcagttc tatgggttgc 1020
 cggccaacga cacatctatc gaactggtac gtagagagca acaggltgt gaaagcatcg 1080
 cactgactga tgacacgctg gtgccattcc tgcggggga aacggtagcg tggctccgtta 1140
 aacaataacc atggttaa 1159

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína recombinante que comprende:

- 5 (a) transformar *E. coli* que carece del gen que codifica pyrC con un vector que comprende un gen que codifica la proteína recombinante y el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre y
 (b) cultivar dicha *E. coli* en condiciones de limitación de pirimidina.

10 2. El método como se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicha proteína recombinante es una proteína humana.

3. El método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2 en el que dicha proteína recombinante es un anticuerpo, o un fragmento del mismo.

15 4. El método como se reivindica en la reivindicación 3 en el que dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

5. *E. coli* que carece del gen que codifica pyrC y transformada con un vector que comprende un gen que codifica una proteína recombinante y el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre.

20 6. *E. coli* que carece del gen pyrC y definida por el número de designación CNM I-3447.

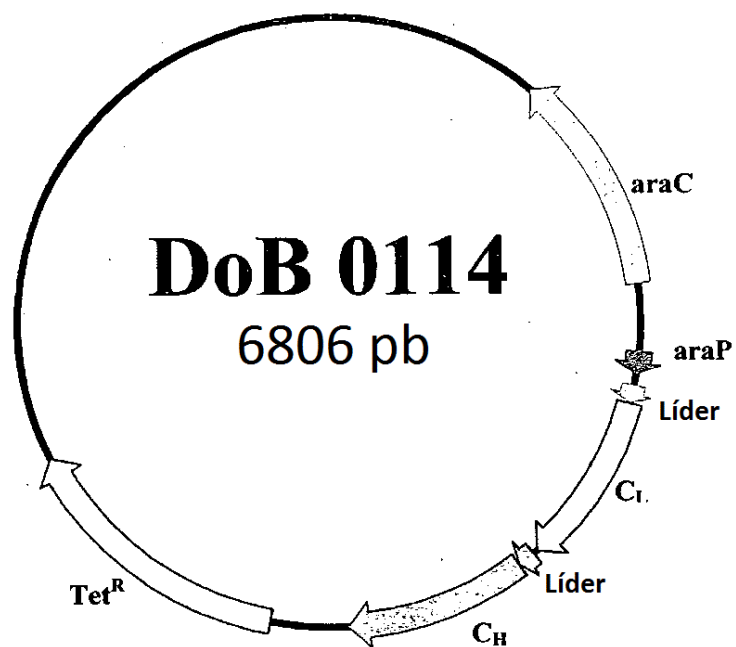
7. *E. coli* de acuerdo con la reivindicación 6 que se transforma con un vector que comprende un gen que codifica una proteína recombinante y el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre.

25 8. Un kit para producir una proteína recombinante que comprende

- (a) una *E. coli* que carece del gen que codifica pyrC, o una *E. coli* como se define en la reivindicación 6; y
 (b) un vector que comprende un gen que codifica una proteína recombinante y el gen pyrC de *E. coli* de tipo silvestre.

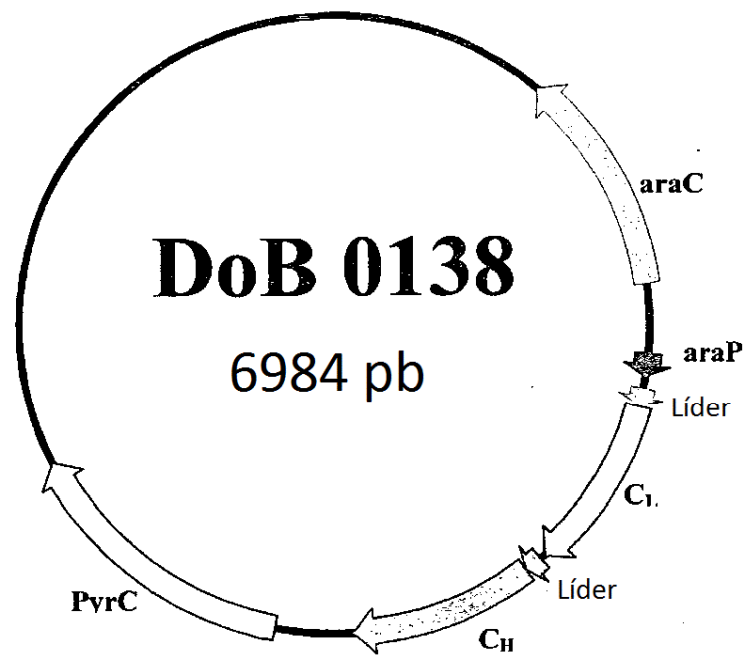
30

Figura 1



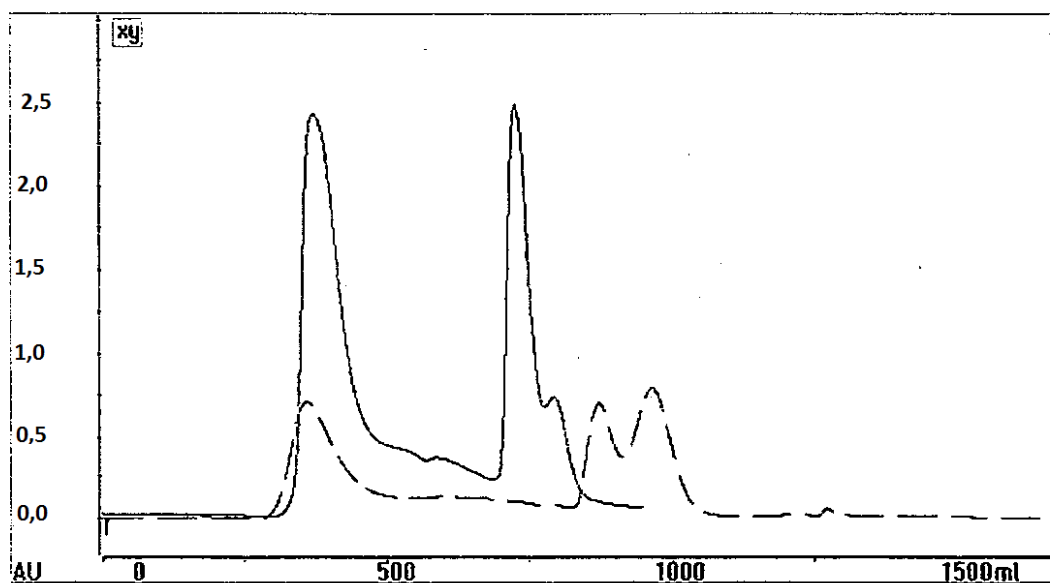
Mapa del vector de expresión de Fab DoB 0114 basado en la selección por resistencia a Tet.

Figura 2



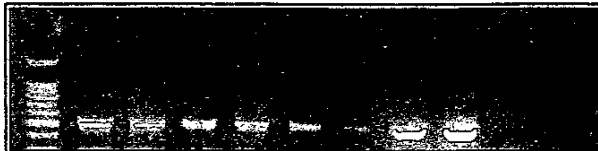
Mapa del vector de expresión de Fab DoB 0138 basado en la estabilización por complementación con PyrC

Figura 3



Elución de la columna de flujo rápido de SP-Sefarosa (Amershan Biosciences) de dos sobrenadantes de fermentación que corresponden al sistema estabilizado con PyrC (DoB 0138-línea continua) y el vector de expresión estabilizado con TET (DoB 0114-línea discontinua)

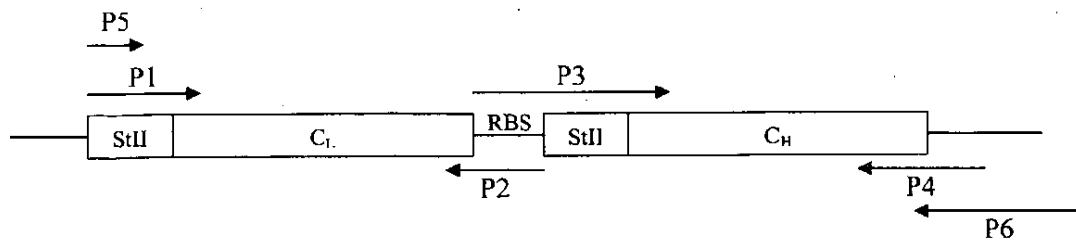
Figura 4

Detección por PCR del vector de expresión			
Fotografía del gel de agarosa al 1,2 %	Carril	Muestra	
	1	Marcadores del peso molecular	
		Vector de expresión	Horas post-inducción
	2	DoB 0138	0
	3	DoB 0138	5
	4	DoB 0138	26
	5	DoB 0114	0
	6	DoB 0114	5
	7	DoB 0114	26
	8	DoB 0138 (control positivo)	
	9	DoB 0114 (control positivo)	
10	PCR mix (control negativo)		

Detección por PCR del vector de expresión:

Las muestras se cosecharon durante la fermentación a las 0, 5 y 26 horas después de la inducción y para compensar el crecimiento las soluciones se ajustaron a una $DO_{600\text{ nm}}$ 0,1. La PCR se realizó como se describe en material y métodos para comprobar la presencia del vector de expresión.

Figura 5



Esquema del conjunto de cassette para amplificar por PCR y clonar el fragmento de Fab.