

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 075**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/73 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2007 E 13191424 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2695943**

54 Título: **Sistema de expresión**

30 Prioridad:

03.02.2006 GB 0602173

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

06.05.2016

73 Titular/es:

FUJIFILM DIOSYNTH BIOTECHNOLOGIES UK LIMITED (100.0%)

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

72 Inventor/es:

**HODGSON, IAN;
LENNON, CHRISTOPHER y
KARA, BHUPENDRA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 075 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de expresión

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

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

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

15 Lanzer *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. vol 85, págs. 8973-7 (1988) dan a conocer la influencia de la ubicación del operador lac en la represión de varios promotores. Becker *et al.*, J. Molecular Biology, vol 349, n.º 4, págs. 716-30 (2005) dan a conocer que la naturaleza y ubicación de los operadores desempeñan una función en la formación de bucles de represión. Edamatsu *et al.*, Gene, vol 187, n.º 2, págs. 289-94 (1997) dan a conocer una expresión en mamíferos que comprende tres operadores lac en dirección 3' respecto al promotor *EF-1 α* humano. Brosius *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. vol 81, vol 81, págs. 6929-22 (1984) dan a conocer la regulación de promotores de ARN ribosómico con un operador lac sintético.

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

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

a) un promotor λ pl; y

b) una secuencia de operador palindrómica perfecta.

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

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

50 El sistema de expresión puede estar integrado en el genoma de célula huésped, pero está comprendido preferiblemente dentro de un elemento extracromosómico tal como un plásmido. Alternativamente, el sistema de expresión puede estar incorporado en vectores de fago o virales y éstos usarse para suministrar el sistema de expresión en el sistema de célula huésped. Pueden ensamblarse plásmidos o vectores de expresión mediante

métodos conocidos en la técnica. El plásmido también comprende normalmente uno o más de los siguientes: un marcador seleccionable, por ejemplo una secuencia que confiere resistencia a antibióticos, una secuencia de estabilidad cer y un casete de expresión. El sistema de expresión también incorpora una secuencia señal si se requiere secreción de la proteína deseada.

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

10 El sistema de expresión de la presente invención se puede emplear para expresar proteínas en células huésped, y especialmente en microorganismos. Tal como se usa en el presente documento, "proteínas" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente 10 aminoácidos. La célula huésped puede ser procarionota o eucariota. Los ejemplos de células procarionotas incluyen células bacterianas, por ejemplo células bacterianas gram-negativas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marsescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, y células bacterianas gram-positivas incluyendo *Bacillus subtilis*. Los ejemplos de células eucariotas incluyen levaduras, tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*. Las células huésped de mamíferos que se pueden emplear incluyen líneas celulares humanas, tales como las células renales embrionarias humanas y PERC.6; líneas celulares murinas, tales como células NS0; y particularmente líneas celulares de hámster tales como las células renales de crías de hámster y especialmente las células de ovario de hámster chino. También se pueden emplear otras células huésped eucariotas tales como las células de hongos filamentosos, plantas, insectos, anfibios o de especies de ovario. Células huésped preferidas son bacterias, particularmente enterobacteriáceas, preferiblemente *E. coli*, y especialmente cepas B o K12 de la misma.

25 El sistema de expresión de la presente invención se emplea comúnmente en forma de un plásmido, y plásmidos que comprenden un promotor λpl y una secuencia de operador palindrómica perfecta forman otro aspecto de la presente invención. Los plásmidos pueden ser plásmidos de replicación autónoma o plásmidos de integración.

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

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

a) un promotor λpl;

b) una secuencia de operador palindrómica perfecta; y

35 c) un casete de expresión para una proteína.

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

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

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

45 1. Generación de series de vectores pAVE

Vector, pAVE012

50 El vector de partida para la generación de pAVE012 fue pZT7#2.0, preparado tal como se describe en el documento US 6.537.779. pZT7#2.0 tiene una estructura principal de vector pAT153, secuencia de estabilidad cer, tet A/R, una secuencia de operador lac nativa individual en el sentido de 5' del gen de interés y un terminador de la transcripción de T4 en el sentido de 5'. Se clonaron un promotor T7A3 y operadores lac palindrómicos perfectos dobles en este plásmido usando ligadores oligonucleotídicos sintéticos por medio de los sitios de enzimas de restricción Nco I, EcoR I y Xba I.

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

Oligonucleótido 1 (SEQ ID NO 1)

5'CATGTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCAAGAACAATCCTGCACG

Oligonucleótido 2.1 (SEQ ID NO 2)

5'AATTCGTGCAGGATTGTTCTTGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCA

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

Vectores pAVE029 y pAVE027

- 10 El vector de partida para la generación de pAVE029 fue pZT7#2.0, preparado tal como se describe en detalle en el documento US 6.537.779. Se clonaron un promotor λ pl y un operador lac palindrómico perfecto individual en este plásmido usando un ligador oligonucleotídico sintético por medio de los sitios de enzimas de restricción EcoR I y Xba I.

Se preparó ligador 78 hibridando los oligonucleótidos 7 y 8

- 15 Oligonucleótido 7 (SEQ ID NO 11)

5'AATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGAGCGGAATT
GTGAGCGCTCACAATCCCA

Oligonucleótido 8 (SEQ ID NO 12)

5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCGCTCAGTATCACCGCCA
GTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGAT

- 20 Entonces se ligó el ligador al plásmido pZT7#2.0 y se transformó en la cepa huésped de clonación XL-1 Blue MR (Stratagene) como fragmento de Xba I/EcoR I. Se realizó un examen inicial de transformantes mediante digestión de restricción usando Nco I. Se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE029.

Se clonó un gen de TNF α humano en este plásmido como fragmento de Nde I/Xho I para generar pAVE027.

25

Vectores pAVE034 y pAVE035

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

Oligonucleótido 9 (SEQ ID NO 39)

5'AATTCATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACT
30 GAGCGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCA

Oligonucleótido 10 (SEQ ID NO 40)

5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATT
TATGTCAACACCGCCAGAGATG

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

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

Vector pAVE020 y pAVE021

- 40 El vector de partida para la generación de pAVE020 fue pAVE012. Se clonó un casete de promotor λ pL en pAVE012 hibridando los oligonucleótidos 7 y 8.

Oligonucleótido 7 (SEQ ID NO 11)

**5'AATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGAGCGGAATT
GTGAGCGCTCACAATTCCCCA**

Oligonucleótido 8 (SEQ ID NO 12)

**5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCGCTCAGTATCACCGCCA
GTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGAT**

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

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

- 10 Vector pAVE046

El vector de partida para la generación del vector de secreción pAVE046 fue pAVE027. Se clonó un casete de expresión de D1.3 Fab (Figura 1, SEQ ID NO 17) como un fragmento de Nde I-Ban HI. Se realizó un examen inicial mediante digestión de restricción de ADN de plásmido. Entonces se confirmó la secuencia mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE046.

- 15

Tabla 1: Resumen de vectores pAVE

| Plásmido | Promotor | Sistema de operador | Comentarios |
|----------|--------------|--|--|
| pAVE041 | tac | Secuencia lac nativa individual | |
| pAVE021 | λ pL | Secuencias palindrómicas perfectas dobles | Separación de operador de 91 pares de bases (DPPS91) |
| pAVE035 | λ pL | Secuencias palindrómicas perfectas dobles | Separación de operador de 92 pares de bases (DPPS92) |
| pAVE027 | λ pL | Secuencia palindrómica perfecta individual | |
| pAVE046 | λ pL | Secuencia palindrómica perfecta individual | Vector de secreción |

2. Generación de cepas recombinantes

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

Tabla 2: Cepas recombinantes construidas

| Huésped | Plásmido | Descripción (proteína:promotor:sistema de operador) | N.º de designación recombinante |
|-----------|----------|---|---------------------------------|
| ATCC27325 | pAVE041 | TNF α :tac:lacO nativo individual | CLD043 |
| ATCC27325 | pAVE021 | TNF α : λ pL:DPPS91 | CLD021 |
| ATCC27325 | pAVE035 | TNF α : λ pL:DPPS92 | CLD038 |
| ATCC27325 | pAVE027 | TNF α : λ pL:SPPS | CLD030 |
| ATCC27325 | pAVE046 | D1.3 Fab: λ pL:SPPS | CLD048 |

Ejemplo 1

Se extrajo un vial de CLD030 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10 µl de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 µg/ml) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO₆₀₀=0,5-0,7. En este punto se indujo un matraz con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,05 mM mientras el otro matraz se dejó sin inducir y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, y acumulación de hTNFα dentro de las células bacterianas. Se determinó el nivel de acumulación de hTNFα usando exploración de densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Se resumen los resultados a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

| Tiempo (horas) | Nivel de acumulación de hTNFα (% de TCP) |
|----------------------|--|
| 4 | 2 |
| 6 | 5 |
| 8 | 9 |
| 24 | 12 |
| 24 (basal, sin IPTG) | No detectado |

Los datos presentados en la Tabla 3 muestran claramente que, sorprendentemente, el control del promotor λpL sumamente potente se puede lograr utilizando una secuencia de operador palindrómica perfecta individual. Los niveles elevados de acumulación del producto se pueden lograr utilizando el sistema de control palindrómico perfecto individual.

Ejemplo 2

Se extrajeron viales de CLD021 y CLD038 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelaran. Se inocularon por separado 10 µl de cada disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 µg/ml) y glucosa (1 g/l). Éstos se incubaron a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 µl de este cultivo para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO₆₀₀=0,5-0,7. En este punto se indujo un matraz con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 1 mM mientras que se dejó sin inducir un segundo matraz y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente, durante la cual se tomaron muestras para la medición del crecimiento, acumulación de hTNFα dentro de las células bacterianas. Se determinó la acumulación de hTNFα usando geles SDS-PAGE teñidos con Colloidal Blue y análisis de inmunotransferencia de tipo Western (usando anticuerpo anti-hTNFα) siguiendo SDS-PAGE de lisados de células completas de las bacterias tomadas como muestra. Se resumen los datos en la tabla 4. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la cepa CLD038 se presenta en la figura 3.

Tabla 4

| Análisis | Acumulación de hTNFα - CLD021 (λpL:DPSS91) | Acumulación de hTNFα -CLD038 (λpL:DPSS92) |
|--|--|---|
| SDS-PAGE con Colloidal Blue (tras la inducción con IPTG) | No detectado | No detectado |
| Transferencia de tipo Western (tras la inducción con IPTG) | Positivo | Positivo (véase la figura 2) |
| SDS-PAGE con Colloidal Blue (Basal sin inducción con IPTG, 24 h) | No detectado | No detectado |

| | | |
|--|--------------|--------------|
| Transferencia de tipo Western (Basal sin inducción con IPTG, 24 h) | No detectado | No detectado |
|--|--------------|--------------|

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

Ejemplo 3

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

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

En la tabla 5 se proporciona la composición del medio de crecimiento discontinuo.

Tabla 5

| Componente | Concentración final [g/l], [mg/l] y [ml/l] de agua purificada |
|---|---|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 14,0 |
| Glicerol | 35,0 |
| Extracto de levadura (Becton Dickinson) | 20,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 16,5 |
| Ácido cítrico | 7,5 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 2,47 |
| H ₃ PO ₄ | 1,5 ml/l |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,294 |
| Antiespumante AF204 | 0,2 ml/l |
| Tetraciclina | 15 mg/l |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 114 mg/l |

| | |
|---|---------|
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 29 mg/l |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 17 mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 9 mg/l |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 4 mg/l |
| H ₃ ·BO ₃ | 12 mg/l |

En la tabla 6 se proporciona la composición de la alimentación de glicerol / cloruro de magnesio.

Tabla 6

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

- 5 Se resumen los resultados en la tabla 7. El perfil de productividad de hTNF α para la cepa CLD030 se presenta en la Figura 4.

Tabla 7

| Cepa | Descripción de vector expresión | DO600 en la recogida | Acumulación de hTNF α (% de TCP) en la recogida | Título de hTNF α (mg/l) en la recogida |
|--------|--|----------------------|--|---|
| CLD018 | Promotor λ pL con secuencia palindrómica perfecta individual | 167 | 7 | 2600 |

- 10 Los datos demuestran claramente la utilidad de los sistemas para la fabricación de proteínas heterólogas. Se lograron altos títulos de producto usando una fermentación no optimizada genérica sencilla y procedimientos de inducción. Las características de control del plásmido pAVE027, según se demuestran mediante el perfil de productividad ejemplificado en la Figura 4, se pueden aprovechar para maximizar la producción de proteínas heterólogas, particularmente proteínas que requieren un control de la expresión para maximizar la secreción.

Ejemplo 4

- 15 Se extrajo un vial de CLD048 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10 μ l de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 μ g/ml) y glucosa (1 g/l). Se incubó el cultivo de siembra a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 μ l de este cultivo para
 20 inocular un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubó el matraz a 37°C, a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta DO₆₀₀=0,5-0,7. En este punto se indujo el matraz con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0,1 mM y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente durante 2 horas adicionales. Entonces se recogieron las células y el medio de crecimiento libre de células residual. Las células
 25 recogidas se sometieron además a fraccionamiento de células por choque osmótico para aislar la fracción celular que contenía proteínas que se habían repartido en la fracción periplásmica de *E. coli* soluble. Se estimó la acumulación de D1.3 Fab biológicamente activo en el extracto periplásmico soluble y en el medio de crecimiento residual determinando la unión de D1.3 Fab a lisozima (antígeno) en un ensayo de ELISA por referencia a una curva patrón preparada con D1.3 Fab activo purificado. La acumulación de D1.3 Fab biológicamente activo en el
 30 periplasma de *E. coli* y en el medio de crecimiento residual (debido a la filtración de material desde el periplasma hasta el medio de cultivo) se presenta en la Tabla 8. La acumulación de D1.3 Fab en el periplasma y medio de crecimiento residual se normalizó como “ μ g de material activo por litro de cultivo por unidad de biomasa (DO₆₀₀)”.

Tabla 8

| Fracción | D1.3 Fab biológicamente activo ($\mu\text{g/l}$ de cultivo/DO) |
|--|---|
| Medio de crecimiento residual | 460 |
| Periplasma | 4020 |
| Total (medio de crecimiento residual + periplasma) | 4480 |

- La utilidad del control proporcionado por este sistema para hacer posible un nivel elevado de secreción de proteínas heterólogas, particularmente aquellas que requieren la formación de enlaces disulfuro complejos, está claramente ejemplificada por la secreción y acumulación de niveles elevados de D1.3 Fab biológicamente activo en el periplasma de *E. coli*. Además, será evidente para los expertos en la técnica la manera en que puede utilizarse la fermentación con alimentación discontinua (por ejemplo, tal como se ha descrito previamente en el Ejemplo 3 o posteriormente en el I inicial Ejemplo 5) para producir tales proteínas con un rendimiento elevado.

Ejemplo 5

- Se repitió el proceso de fermentación descrito en el Ejemplo 3 utilizando CDL048. La inducción se llevó a cabo mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,15 mM una vez que el nivel de biomasa en la fermentación alcanzó $\text{DO}_{600} = \text{aprox } 50$. La fase de alimentación discontinua se prolongó durante 35-45 h después de la inducción. Entonces se recogieron las células y el medio de crecimiento libre de células residual. Las células recogidas se sometieron además a fraccionamiento de células por choque osmótico para aislar la fracción celular que contenía proteínas que se habían repartido en la fracción periplásmica de *E. coli* soluble. Se estimó la acumulación de D1.3 Fab biológicamente activo en el extracto periplásmico soluble y en el medio de crecimiento residual determinando la unión de D1.3 Fab a lisozima (antígeno) en un ensayo de ELISA por referencia a una curva patrón preparada con D1.3 Fab activo purificado. La acumulación de D1.3 Fab en el periplasma de *E. coli* y en el medio de crecimiento residual se normalizó como "mg de material activo por litro de cultivo".
- La acumulación de D1.3 Fab biológicamente activo en el periplasma de *E. coli* y en el medio de crecimiento residual (debido a la filtración de material desde el periplasma hasta el medio de cultivo) se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9

| Fracción | D1.3 Fab biológicamente activo (mg/l de cultivo) |
|--|--|
| Medio de crecimiento residual | 525 |
| Periplasma | 57 |
| Total (medio de crecimiento residual + periplasma) | 582 |

Se demuestra un nivel elevado de secreción de D1.3 Fab biológicamente activo utilizando el sistema de expresión.

Ejemplo 6

- Se diseñó un diacuerpo tetravalente monocatenario biespecífico sintético (bsctDb), en el que se unieron las regiones ligera variable y pesada variable de D1.3 (anticuerpo anti-lisozima) y A5B7 (anticuerpo anti-CEA (antígeno carcinoembrionario)) en una única cadena polipeptídica. La secuencia de ADN para esta molécula se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO 22). Esto se clonó como fragmento de Nde I/Not I en pAVE046 que se había digerido con Nde I y Not I. Se examinaron plásmidos recombinantes mediante digestión de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. El plásmido resultante se denominó pAVE078. Se transformó pAVE078 en W3110 de *E. coli* para preparar CLD073, que se purificó y se mantuvo en disoluciones madre en glicerol a -80°C .

- Se extrajo un vial de CLD0073 del congelador a -80°C y se dejó que se descongelara. Se inocularon 10 μl de la disolución madre en glicerol descongelada en 5 ml de caldo de Luria (LB, extracto de levadura 5 g/l (Oxoid), triptona 10 g/l (Oxoid) y cloruro de sodio 5 g/l) complementado con tetraciclina (10 $\mu\text{g/ml}$) y glucosa (1 g/l). Esto se incubó a 37°C en un agitador orbital durante 16 h. Entonces se usaron 500 μl de este cultivo para inocular dos matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de Luria (composición tal como se describió anteriormente). Se incubaron los matraces a 37°C , a 200 rpm en un agitador orbital. Se monitorizó el crecimiento hasta $\text{DO}_{600}=0,5-0,7$. En este punto se indujeron los matraces con IPTG hasta una concentración final de o bien 0,5 mM o bien 0,1 mM y se continuó la incubación, en las condiciones descritas anteriormente durante 20 horas adicionales. Entonces se recogieron las células y el medio de crecimiento libre de células residual. Se sometieron además las células

recogidas a fraccionamiento de células por choque osmótico para aislar la fracción celular que contenía proteínas que se habían repartido en la fracción periplásmica de *E. coli* soluble. Se estimó la expresión, la secreción, el plegado y la acumulación de bsctDb D1.3-A5B7 biológicamente activo en el extracto periplásmico y medio de crecimiento residual determinando la inhibición de unión de un anticuerpo monoclonal anti-CEA a CEA (antígeno) en un ensayo de ELISA competitivo y mediante la unión de un fragmento de anticuerpo Fab anti-lisozima a lisozima (antígeno) en un ensayo de ELISA competitivo.

Los datos obtenidos indicaron que la mayor parte de bsctDb D1.3-A5B7 se repartió en el medio de crecimiento residual (fuga del periplasma) al final de la inducción. Estos datos (unión de bsctDb en ensayo de ELISA competitivo) se muestran en la tabla 10. Los datos obtenidos demuestran que la muestra de medio de crecimiento residual del cultivo inducido con IPTG 0,5 mM inhibe completamente la unión de los anticuerpos tanto anti-CEA como anti-lisozima en los ensayos de ELISA por competencia. La muestra de medio de crecimiento residual del cultivo inducido con IPTG 0,1 mM muestra un nivel reducido de inhibición lo que indica un nivel de acumulación inferior de bsctDb D1.3-A5B7 biológicamente activo en esta muestra.

Tabla 10

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

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

Lista de secuencias

- <110> FUJIFILM Diosynth Biotechnologies UK Limited
 - <120> Sistema de expresión
 - <130> BIL 81005 EPT D5
 - <141> 01-02-2007
 - <150> GB 0602173.7
 - <151> 03-02-2006
 - <160> 40
 - <170> PatentIn versión 3.3
 - <210> 1
 - <211> 47
 - <212> ADN
 - <213> Artificial
 - <220>
 - <223> Oligonucleótido 1 utilizado en la preparación del ligador 12.1
 - <400> 1
- catgtgggaa ttgtgagcgc tcacaattcc aagaacaatc ctgcacg 47

ES 2 569 075 T3

<210> 2
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido 2.1 utilizado en la preparación del ligador 12.1
 <400> 2
 aattcgtgca ggattgttct tggaattgtg agcgctcaca attcca 47
 <210> 3
 10 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 3 utilizado en la clonación del promotor T7A3
 15 <400> 3
 aattcaaaaca aaacggttga caacatgaag taaacacggt acgatgtacc ggaattgtga 60
 gcgctcaciaa ttcccca 77
 <210> 4
 <211> 77
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 4 utilizado en la clonación del promotor T7A3
 <400> 4
 ctggtggggg gttgtgggcg ctcgcggttc cgggtgcgtcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60
 gtcggccggtt ttgtttg 77
 25 <210> 5
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido 11 utilizado en la preparación del ligador 1112
 <400> 5
 aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc ggatactgtg tggaattgtg 60
 agcggataac aattcccca 79
 <210> 6
 <211> 79

ES 2 569 075 T3

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 12 utilizado en la preparación del ligador 1112
 5 <400> 6
ctagtgggga attgttatcc gtcacaatt ccacacagta tccgagccga tgattaattg 60
tcaacagctc atttcagaa 79
 <210> 7
 <211> 78
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 13 utilizado en la preparación del ligador 1314
 <400> 7
aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc ggatactgtg tgggaattgtg 60
agcgcgcaca attcccaca 78
 15 <210> 8
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido 14 utilizado en la preparación del ligador 1314
 <400> 8
ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacagtat ccgagccgat gattaattgt 60
caacagctca tttcagaa 78
 <210> 9
 <211> 78
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 5 utilizado en la clonación del promotor T7A3
 <400> 9
aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60
 30 **agcgcgcaca attcccaca 78**
 <210> 10
 <211> 78
 <212> ADN

ES 2 569 075 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 6 utilizado en la clonación del promotor T7A3
 <400> 10

5

ctgggtggggg gttgtgggcg ctcgcggttc cgggtgcgctcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60
gtcggccggt ttgtttcg 78

<210> 11
 <211> 77
 <212> ADN

10

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido 7 utilizado en la preparación del ligador 78
 <400> 11

aattatctct ggcggtgttg acataaatac cactggcggt gatactgagc ggaattgtga 60
gcgctcaciaa ttcccca 77

15

<210> 12
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

20

<223> Oligonucleótido 8 utilizado en la preparación del ligador 78
 <400> 12

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg 60
tcaacaccgc cagagat 77

<210> 13

25

<211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido 15 utilizado en la clonación del promotor tac

30

<400> 13

aattcctgaa atgagctgtt gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga 60
gcgctcaciaa ttcccca 77

<210> 14
 <211> 77

ES 2 569 075 T3

| | | |
|----|--|------------|
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido 16 utilizado en la clonación del promotor tac | |
| 5 | <400> 14 | |
| | ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt | 60 |
| | caacagctca tttcagg | 77 |
| | <210> 15 | |
| | <211> 33 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido 19 utilizado en la preparación del ligador EcoR I | |
| | <400> 15 | |
| | aattcaccgg tgtacagtca tgtacaaccg gtg | 33 |
| 15 | <210> 16 | |
| | <211> 33 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Oligonucleótido 20 utilizado en la preparación del ligador EcoR I | |
| | <400> 16 | |
| | aattcaccgg ttgtacatga ctgtacaccg gtg | 33 |
| | <210> 17 | |
| | <211> 1550 | |
| 25 | <212> ADN | |
| | <213> Murinae gen. sp. | |
| | <400> 17 | |
| | catatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt tattactcgc tgcccaacca | 60 |
| | gcgatggccc aggtgcagct gcaggagtca ggacctggcc tggatggcgc ctcacagagc | 120 |
| | ctgtccatca catgcaccgt ctcaggggtc tcattaaccg gctatgggtgt aaactggggtt | 180 |
| | cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tttggggtga tggaaacaca | 240 |
| | gactataatt cagctctcaa atccagactg agcatcagca aggacaactc caagagccaa | 300 |
| | gttttcttaa aaatgaacag tctgcacact gatgacacag ccaggtacta ctgtgccaga | 360 |

ES 2 569 075 T3

gagagagatt ataggcttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcagcc 420
 tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctccagta gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcacia ccccagcaac accaaggtcg acaagaaagt tgagccaaa 720
 tcttcaacta agacgcacac atcaggaggt gaacagaagc tcattctcaga agaggatctg 780
 aattaataag ggagcttga tgcaaattct atttcaagga gacagtcata atgaaatacc 840
 tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgtctg ccaaccagcg atggccgaca 900
 tcgagctcac ccagtctcca gcctcccttt ctgctctgtg gggagaaact gtcaccatca 960
 catgtcagc aagtgggaat attcacaatt atttagcatg gtatcagcag aaacagggaa 1020
 aatctcctca gtcctgggtc tattatacaa caaccttagc agatggtgtg ccatcaaggt 1080
 tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg caacctgaag 1140
 cttttgggag ttattactgt caacatTTTT ggagtactcc tcggacgttc ggtggagggg 1200
 ccaagctcga gatcaaacgg actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg 1260
 atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca 1320
 gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 1380
 gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga 1440
 gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga 1500
 gttcggccgt cacaaagagc ttcaaccgcg gagagtcata gtaaggatcc 1550

<210> 18

< 211> 72

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 21 utilizado en la preparación del ligador 2122

<400> 18

aattcgaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cacatgaaac 60

gacagtgagt ca 72

10 <210> 19

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido 22 utilizado en la preparación del ligador 2122

<400> 19

ES 2 569 075 T3

| | | |
|----|--|-----------|
| | ctagtgactc actgtcgttt catgtggtac ctcgtaccgt gtttacttca tgttgtcaac | 60 |
| | cgttttgttt cg | 72 |
| | <210> 20 | |
| | <211> 79 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido 23 utilizado en la preparación del ligador 2324 | |
| | <400> 20 | |
| | aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg | 60 |
| | agcggataac aattcccca | 79 |
| 10 | <210> 21 | |
| | <211> 79 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Oligonucleótido 24 utilizado en la preparación del ligador 2324 | |
| | <400> 21 | |
| | ctagtgggga attgttatcc getcacaatt cgggtacatc gtaccgtgtt tacttcatgt | 60 |
| | tgtcaaccgt tttgtttcg | 79 |
| | <210> 22 | |
| | <211> 1592 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Secuencia que codifica el diacuerpo tetravalente monocatenario biespecífico producido en el Ejemplo 15 | |
| 25 | <400> 22 | |

ES 2 569 075 T3

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

<210> 23

<211> 1237

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia que codifica la proteína de fusión GST producida en el Ejemplo 16

<400> 23

ES 2 569 075 T3

catatgtccc ctatactagg ttattggaaa attaagggcc ttgtgcaacc cactcgcactt 60
 cttttggaat atcttgaaga aaaatatgaa gagcatttgt atgagcgcga tgaaggtgat 120
 aatggcga acaaaaagtt tgaattgggt ttggagtttc ccaatcttcc ttattatatt 180
 gatggtgatg ttaaattaac acagtctatg gccatcatac gttatatagc tgacaagcac 240
 aacatgttgg gtggttgtcc aaaagagcgt gcagagattt caatgcttga aggagcggtt 300
 ttggatatta gatacgggtg ttcgagaatt gcataatagta aagactttga aactctcaaa 360
 gttgattttc ttagcaagct acctgaaatg ctgaaaatgt tcgaagatcg tttatgtcat 420
 aaaacatatt taaatggtga tcatgtaacc catcctgact tcatgttga tgacgtctct 480
 gatgttgttt tatacatgga cccaatgtgc ctggatgcgt tcccaaaatt agtttgtttt 540
 aaaaaacgta ttgaagctat cccacaaatt gataagtact tgaaatccag caagtatata 600
 gcatggcctt tgcagggctg gcaagccacg tttgggtgtg gcgaccatcc tccaaaatcg 660
 gatctggttc cgcgtggatc cggaccaaac acagaatttg cactatccct gttaaggaaa 720
 aacataatga ctataacaac ctcaaagga gagttcacag ggtaggcat acatgatcgt 780
 gtctgtgtga taccacaca cgcacagcct ggtgatgatg tactagtga tggtcagaaa 840
 attagagtta aggataagta caaattagta gatccagaga acattaatct agagcttaca 900
 gtgttgactt tagatagaaa tgaaaaatc agagatatca ggggatttat atcagaagat 960
 ctagaaggtg tggatgccac tttggtagta cattcaaata actttacca cactatctta 1020
 gaagtggcc ctgtaacaat ggcaggactt attaatttga gtagcaccoc cactaacaga 1080
 atgattcgtt atgattatgc aacaaaaact gggcagtggt gaggtgtgct gtgtgctact 1140
 ggtaagatct ttggtattca tgttggcggg aatggaagac aaggattttc agctcaactt 1200
 aaaaaacaat attttgtaga gaaacaataa gaattcc 1237

<210> 24

<211> 513

5

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

catatgatgt gtgatctgcc gcaaaactcat agcctgggta gccgtcgcac cctgatgctg 60
 ctggcccaaa tgcgccgtat ctccctgttc tcctgtctga aagaccgcca tgactttggc 120
 ttcccgcagg aagagttcgg taaccagttc caaaaggcag aaactatccc ggtactgcac 180
 gaaatgattc aacagatttt taacctgttc agcactaaag actcctctgc tgcatgggac 240
 gaaactctcc tggacaaatt ctacaccgaa ctgtaccagc aactgaacga cctggaagcc 300
 tgcgtcatcc aggtgttgg cgtaaccgaa actccgctga tgaaagaaga ctccatcctg 360
 gctgttcgca aatacttcca gcgtatcacc ctgtacctga aagagaagaa atacagcccg 420
 tgcgcttggg aagttgtacg cgctgaaatc atgcgttcct tcagcctgtc cactaacctg 480
 caagaatctc tgcgtagcaa agaataactc gag 513

<210> 25

ES 2 569 075 T3

<211> 517

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

5
 catatggctc cgccacgtct gatttgtgac tctcgcgttc tggagcgta cctgctggag 60
 gccaaaggaag ccgaaaacat cacgaccggt tgtgcggaac attgctctct gaatgagaac 120
 atcactgttc cggatacga ggttaacttc tacgcttggg aacgatgga agtaggccag 180
 caggcagtag aagtgtggca gggctggcg ctgctgtccg aagcggttct gcgtggccag 240
 gcgctgctgg tcaactccag ccagccgtgg gagccgctgc agctgcacgt agataaagcg 300
 gttagcggtc tgcgttcctt gactaccctg ctgcgcgcg tgggtgcgca aaaagaagct 360
 atctccccgc cagatgoggc atctgcagcc ccgctgcgta ccatcactgc agatactttc 420
 cgcaagctgt ttcgtgttta ttccaacttc ctgctgtgta aactgaagct gtacaccggt 480
 gaagcgtgcc gtaccggcga tcgttaataa actcagag 517

<210> 26

<211> 713

<212> ADN

10 <213> *Pseudomonas putida*

<400> 26

catatgaagg aaataaccaa tgaaaaacat ccaaggtatc gttttcgatt tgtatggcac 60
 gctctacgac gtgcattccg tggtgcaagc ctgtgaagag gtctatccgg gccaaaggcga 120
 cgctatttct cgcctctggc ggcaaaagca attggaatac acctggctca ggagcctcat 180
 gggccgttac gtgaactttg agaaagcaac agaggatgcc ttgctgttta cctgcacgca 240
 tctgggcttg tcgctcgatg atgaaaccca ccagcgcctc agtgatgctt atttgcacct 300
 cacccttat gccgatacag ctgacgccgt tcgccgtttg aaagctgagg gcctaccgct 360
 aggcattcatt tcaaatgggt ctctattgctc gatcgagcaa gtcgtgacta actctgaaat 420
 gaattgggag ttcgatcagc tgatcagcgt cgaggatgtg caagtgttca aacctgatag 480
 tcgctctat agccttgccg agaagcgcag gggttttcca aaggaaaaca tcctcttcgt 540
 ttcgtcaaac gcgtgggatg cgagtgcagc cagtaacttt ggtttccggg tttgctggat 600
 caatcggcag aacggcgcgt ttgatgagct ggatgcaaag ccgacacacg tcgtgcgtaa 660
 tctcgcgcaa atgtcgaact ggctgggtaa ttogctcgat taatgaagga tcc 713

<210> 27

<211> 26

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador F37A utilizado en el Ejemplo 17

ES 2 569 075 T3

<400> 27
 agatctacgc ttatgggtgc cttcc 26
 <210> 28
 <211> 26
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador B29a utilizado en el Ejemplo 17
 <400> 28
 10 agatctaata cgcaaaccgc ctctcc 26
 <210> 29
 <211> 69
 <212> AND
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido GalB1 utilizado en la preparación del ligador GalB
 <400> 29
aattcatacc ataagcctaa ttctacgaat tatcagagtt ctggttaccg gtgtaagcgc 60
ttacactgt 69
 <210> 30
 20 <211> 69
 <212> AND
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido GalB2 utilizado en la preparación del ligador GalB
 25 <400> 30
ctagacagtg taagcgctta caccggtaac cagaactctg ataattcgta gaattaggct 60
tatggtatg 69
 <210> 31
 <211> 68
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido GalA1 utilizado en la preparación del ligador GalA
 <400> 31
caattgtgta agcgcttaca caactttatt ccatgtcaca cttttcgcac ctttgttatg 60
ctatggtg 68

ES 2 569 075 T3

<210> 32
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido GalA2 utilizado en la preparación del ligador GalA
 <400> 32
aattcaccat cgcataacaa ggatgcgaaa agtgtgacat ggaataaagt tgtgtaagcg 60
cttacacaat tg 72
 <210> 33
 10 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia que codifica el promotor hCMV y los operadores Lac utilizados en el Ejemplo 21
 15 <400> 33
catatgccaa gtccgcccc tattgacgtc aatgacgta aatggcccgc ctggcattat 60
gcccagtaca tgaccttacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc 120
gctattatac catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga tagcggtttg 180
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 240
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtataaaccccgcccgttgacg caaatgggga 300
attgtgagcg ctcaaatc ctctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatca 360
ctagatgcgt acagtccgat gacttgcgtg gaattgtgag cgctcacaat tccaagcttt 420
attgcggtat aggctagc 438
 <210> 34
 <211> 813
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia que codifica la proteína IgG Fc utilizada en el Ejemplo 21
 <400> 34

ES 2 569 075 T3

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

<210> 35.

<211> 1104

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de clones 1 utilizada en el Ejemplo 20

<400> 35

ES 2 569 075 T3

ctcgaggcat gtgctctgta tgtatataaa actcctgttt tcttcttttc tctaaatatt 60
ctttccttat acattaggac ctttgcagca taaattacta tacttctata gacacgcaaa 120
cacaatata cactactaat ggcggagctg aattacattc ccaaccgctg ggcacaacia 180
ctggcgggca aacagtogtt gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcaacgctg 240
ccgtcgcaaa ttgtcggggc gattaaatct cgcgccgatc aactgggtgc cagcgtgggtg 300
gtgtcgatgg tagaacgaag cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcgggtgca caatcttctc 360
gcgcaacgctg tcagtgggct gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct 420
gtggaagctg cctgcactaa tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc 480
atcaacagta ttattttctc ccatgaagac ggtacgcgac tgggcgtgga gcatctggtc 540
gcattgggtc accagcaaat cgcgctgtta gcgggcccat taagttctgt ctcggcgctg 600
ctgctctgctg ctggctggca taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa 660
cgggaaggcg actggagtgc catgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag 720
ggcatcgttc cactcggat gctggttgcc aacgatcaga tggcgtggg cgcaatgcgc 780
gccattaccg agtccgggct gcgcttggt ggggatctct cggtagtggg atacgacgat 840
accgaagaca gctcatgtta tatcccgccg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgctg 900
ctggggcaaa ccagcgtgga ccgcttgctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc 960
aatcagcttt tgcccgtctc actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa 1020
accgctctc cccgcgctt gcccgattca ttaatgcagc tcgcacgaca ggtttcccga 1080
ctggaagcg ggcagtgact cgag 1104

<210> 36

<211> 1026

<212> ADN

5

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de clones 2 utilizada en el Ejemplo 20

<400> 36

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

10

ES 2 569 075 T3

| | | |
|----|---|------|
| | aattaggcca tcaacgacag taaatTTTgc cgaatTTaat agcttctact gaaaaacagt | 300 |
| | ggaccatgtg aaaagatgca tctcatttat caaacacata atattcaagt gagccttact | 360 |
| | tcaattgtat tgaagtgcaa gaaaaccaa aagcaacaac aggttttTgga taagtacata | 420 |
| | tataaggGaa ttgtgagcgc tcacaattcc tgttactgtt cttacgattc atttacgatt | 480 |
| | caagaatagt tcaaacaaga agattacaaa ctatcaatgg aattgtgagc gctcacaatt | 540 |
| | ccaagaatga gatttccttc aatTTTtact gctgTTTtat tgcgagcacc ctccgcatta | 600 |
| | gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgtc | 660 |
| | atcggttact cagatttaga aggggatttc gatgTtgctg tttTgccatt ttccaacagc | 720 |
| | acaaataacg ggTtattgtt tataaatact actattgcca gcattgctgc taaagaagaa | 780 |
| | ggggtatctc tcgagaaaag agaggctgaa gctgctcaag aaccagtaa aggtcctgtg | 840 |
| | tctactaagc caggttcttg tcctattatc ttgattcgtt gcgctatgtt aaaccacct | 900 |
| | aaccgttgtt tgaaggacac tgattgtcca ggtatcaaaa agtgctgtga aggttcctgc | 960 |
| | ggtatggctt gtttcgttcc acaagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgtaatag | 1020 |
| | cagctg | 1026 |
| | <210> 37 | |
| | <211> 78 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido 17 utilizado en la clonación del promotor tac | |
| | <400> 37 | |
| | aatTTTctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggaattgtg | 60 |
| | agcgcTcaca attcccca | 78 |
| 10 | <210> 38 | |
| | <211> 78 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Oligonucleótido 18 utilizado en la clonación del promotor tac | |
| | <400> 38 | |
| | ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt | 60 |
| | caacagctca tttcagaa | 78 |
| | <210> 39 | |
| | <211> 78 | |
| 20 | <212> AND | |
| | <213> Artificial | |

ES 2 569 075 T3

<220>

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

<400> 39

aattcatctc tggcgggtgtt gacataaata ccaactggcgg tgatactgag cggaattgtg 60
agcgctcaca attcccca 78

5

<210> 40

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10

<223> Oligonucleótido 10 utilizado en la clonación del promotor lambda pL

<400> 40

ctagtgggga attgtgagcg ctcaacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatztatg 60
tcaacaccgc cagagatg 78

REIVINDICACIONES

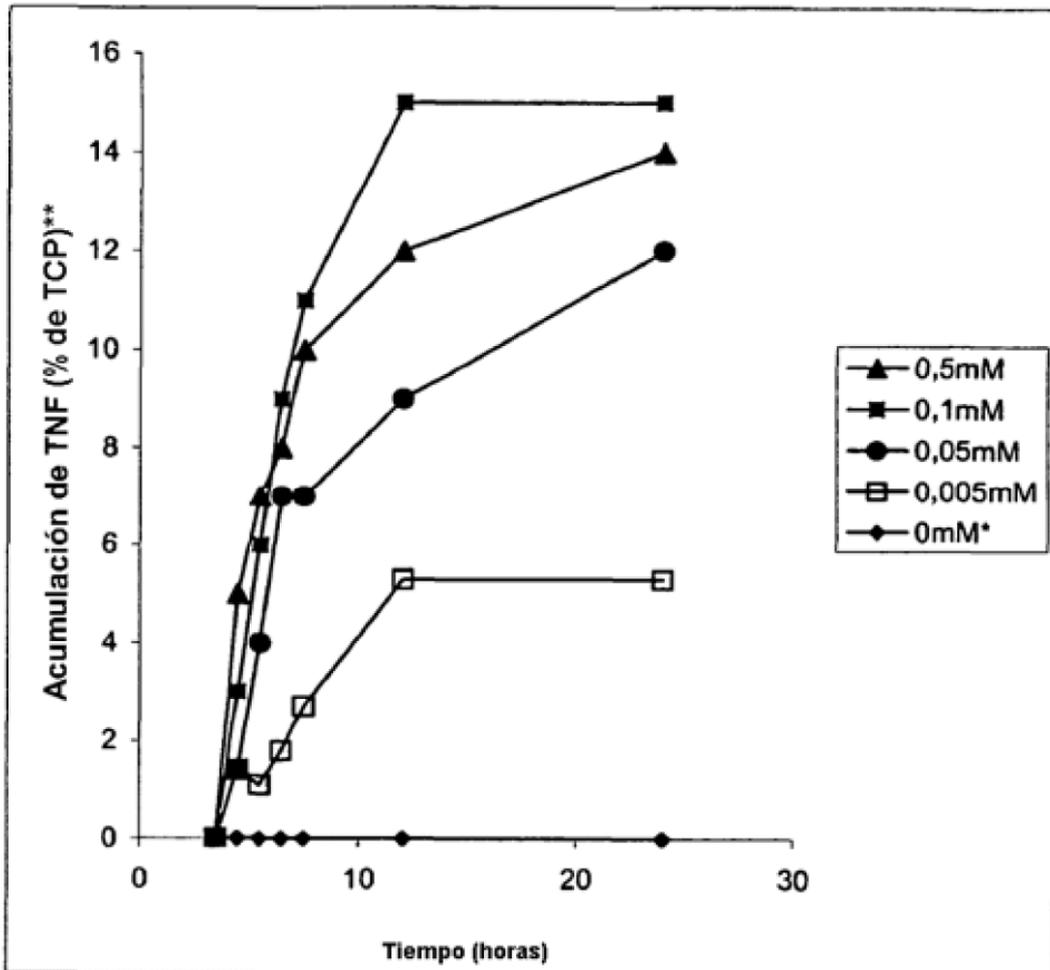
1. Un sistema de expresión de proteínas que comprende:
 - a) un promotor λ pL; y
 - b) una secuencia de operador palindrómica perfecta.
- 5 2. Un vector que comprende:
 - a) un promotor λ pL; y
 - b) una secuencia de operador palindrómica perfecta.
3. Un vector de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende un casete de expresión para una proteína.
- 10 4. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el vector es un plásmido, preferentemente un plásmido de replicación autónoma.
5. Una célula huésped transformada por un vector tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 15 6. Un método para la producción de una proteína recombinante que comprende expresar un sistema de expresión que comprende:
 - a) un promotor λ pL;
 - b) una secuencia de operador palindrómica perfecta; y
 - c) un casete de expresión para una proteína recombinante.
- 20 7. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el sistema operador es lac, gal, deo o gln.
8. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se emplea una secuencia de operador palindrómica perfecta, que preferentemente está ubicada en dirección 3' respecto al promotor.
- 25 9. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde se emplea un operador palindrómico perfecto individual.
10. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el operador tiene la secuencia GGAATTGTGAGCGCTCACAATTCC (nucleobases 51 a 74 de SEQ ID NO. 3) o AATTGTGAGCGCTCACAATT (nucleobases 53 a 72 de SEQ ID NO. 3).
- 30 11. Un sistema de expresión, vector, célula huésped o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde un operador se superpone al punto de inicio de la transcripción.
12. Un método para producir una proteína, que comprende:
 - a) cultivar una célula huésped transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 3; y
 - b) recuperar la proteína.
- 35 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la célula huésped es *E. coli*.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde el vector es un vector tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde un operador se superpone al punto de inicio de la transcripción.

Figura 1

Secuencia de D1.3

CATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCAA
CCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT
CACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTG
TAAACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTTGG
GGTGATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAG
GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCACACTGATGACACAG
CCAGGTACTIONTGTGCCAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC
ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACTGTGCCCTCCAGTAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAACCCAGCAACACCAAGGTGACAAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTCAACTAAGAC
GCACACATCAGGAGGTGAACAGAAGCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAATAAGG
GAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTA
CGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCCGACATCGAG
CTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACA
TGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGA
AAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAACAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAAC
CTGAAGCTTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCCG
TGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACCGCGG
AGAGTCATAGTAAGGATCC

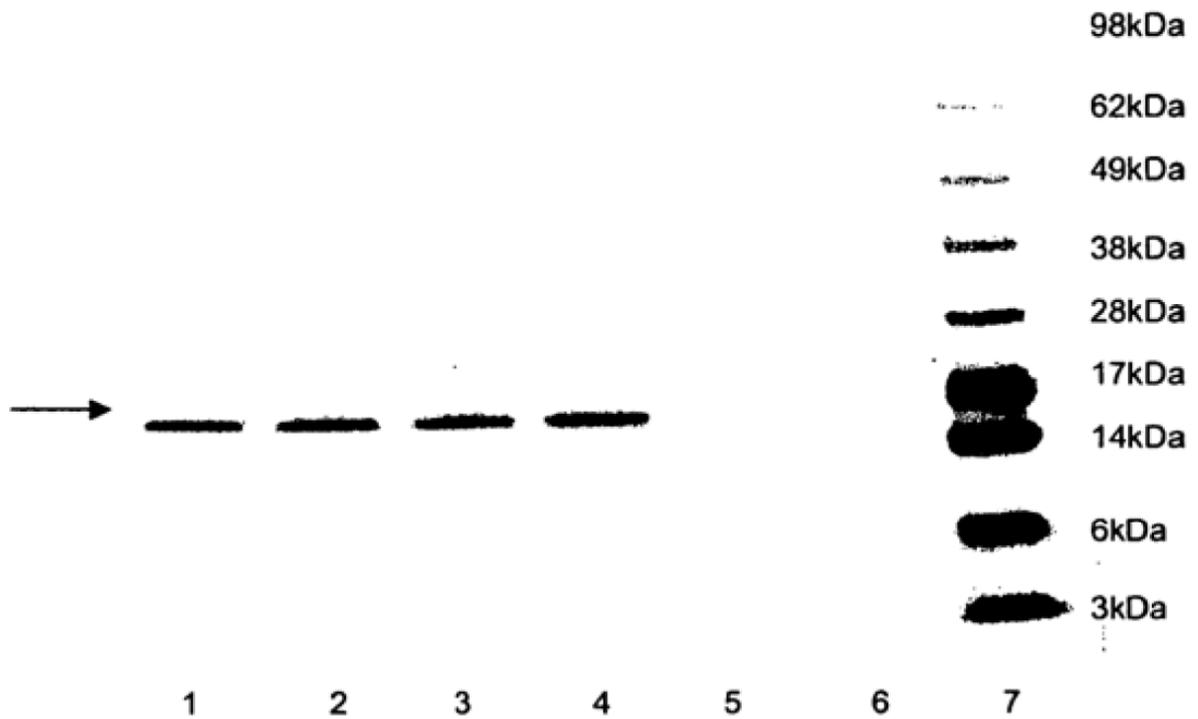
Figura 2



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

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

Figura 3



La flecha indica la banda de hTNF α

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

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

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

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

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

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

Carril 7: Marcadores de peso molecular

Figura 4

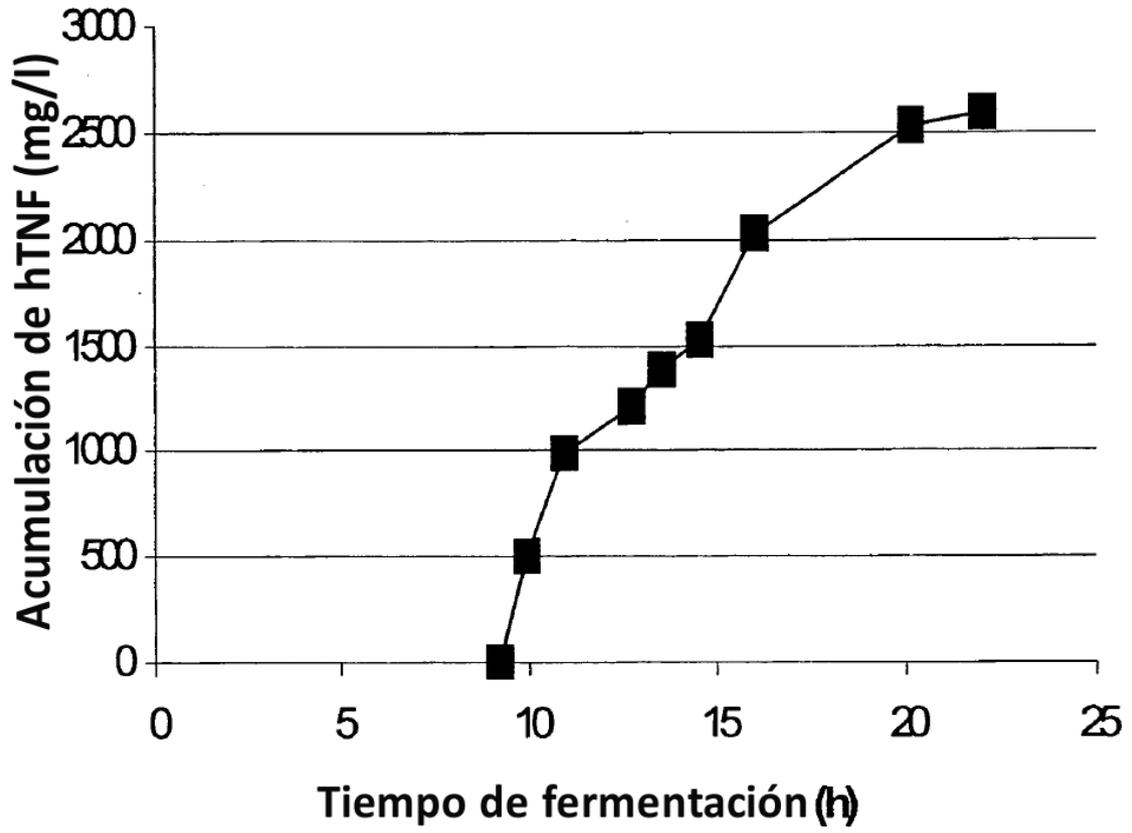


Figura 5

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

CATATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTA
GCTCAAGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCAC
AGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTGTAA
ACTGGGTTCCGCGAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTTGGGGT
GATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGAC
AACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCACACTGATGACACAGCCA
GGTACTACTGTGCCAGAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGAGCGCCAAAACCACCCC
GGACATCGAGCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG
TCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAACCTTACATTCAGTGGTACCAGCAGA
AGCCAGGATCCTCCCCCAAATCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAG
TCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACATTGGAGTAGTAAACCAC
CGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGCGCGCCGATGC
CGCCCCGACCGTGCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGTGGTGGCTTAGTTCAACCTG
GTGGTTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCACTGATTACTACAT
GAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTGGAA
ACAAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTTCGGTTCACCA
TCTCCAGAGATAAATCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGA
GGACAGTGCCACTTATTACTGTACAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCTACTTTGACTA
CTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGA
GCGCCAAAACCACCCCGGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCG
TCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATT
TAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAAC
AACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATA
TTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAACCTGAAGCTTTTGGGAGTTATTACTGTCAACAT
TTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGAC
TGTGGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCATGATAAGCGGC
CGC