

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 252**

51 Int. Cl.:

C07K 14/61	(2006.01)
C12N 1/16	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
C12R 1/19	(2006.01)
C07K 14/245	(2006.01)
C12N 15/70	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2009 PCT/EP2009/064903**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10052335**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2009 E 09751899 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2356142**

54 Título: **Cepa de E. coli BL21 que carece de un complejo génico funcional de los genes capsulares del grupo II**

30 Prioridad:

10.11.2008 EP 08168750

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2017

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**WÖLDIKE, HELLE FABRICIUS;
DENG, JIANHUI;
ZHAO, XIN;
LIU, YUN y
SU, JING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 612 252 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

Cepa de *E. coli* BL21 que carece de un complejo génico funcional de los genes capsulares del grupo II

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la manipulación del genoma de *Escherichia coli* (*E. coli*), a una cepa de *E. coli* B mejorada no patógena, y a su uso para la producción de péptidos y proteínas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las bacterias se han utilizado para producir una amplia gama de productos comerciales. El uso de bacterias modificadas genéticamente del tipo *E. coli* como células hospedadoras para la producción de reactivos biológicos, tales como péptidos y ácidos nucleicos en el laboratorio y la industria, es bien conocido en la técnica. Las bacterias en su entorno natural están expuestas a muchas condiciones que normalmente no se experimentan en un cultivo industrial o de laboratorio convencional, y por lo tanto sus genomas son portadores de una gran cantidad de genes inducidos por el estrés, dependientes de condiciones o genes que de otro modo no son esenciales, los cuales puede que no sean necesarios en el uso industrial o de laboratorio de los organismos, o que incluso que no sean deseados.

15 Los agentes patógenos bacterianos contienen factores de virulencia tales como polisacáridos capsulares en la superficie celular, que median en las interacciones entre la bacteria y su entorno inmediato y que tienen una serie de funciones directamente relacionadas con su patogenicidad. En *E. coli* se han descrito más de 80 tipos de cápsulas de polisacáridos que son serológica y químicamente distintas y que se denominan antígenos K. Las cápsulas de polisacáridos se han clasificado en 4 grupos, de los cuales los polisacáridos capsulares del grupo II son similares a los de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Los complejos génicos (del inglés, "clusters") de genes capsulares del grupo II contienen la mayor parte de los tipos capsulares asociados con enfermedad invasiva y tienen una organización genética conservada que consiste en tres regiones funcionales. Las regiones 1 y 3 se conservan entre los complejos génicos del grupo II y codifican péptidos necesarios para el transporte del polisacárido desde su sitio de síntesis a la superficie celular, mientras que la región 2 es específica del serotipo y codifica las enzimas responsables de la biosíntesis y la polimerización de los monosacáridos individuales que comprenden el polisacárido particular. La región 1 comprende 6 genes *kpsFEDUCS*, organizados en una sola unidad transcripcional. La región 2 es específica del fenotipo y difiere entre los antígenos del grupo 2. La región 3 contiene 2 genes, *kpsM* y *kpsT*, organizados en una única unidad transcripcional [Andreishcheva et al. Gen (2006) 384: 113-119].

25 Las cepas de *E. coli* K-12 y B no están encapsuladas y son cepas que se utilizan comúnmente para la producción de péptidos. El genoma de *E. coli* K-12 se ha secuenciado completamente y no contiene ningún gen capsular. Se ha encontrado que *E. coli* B BL21 (DE3), que es una cepa preferida para una expresión de alto rendimiento de péptidos recombinantes, contiene un complejo génico que codifica los polisacáridos capsulares del grupo II y se piensa que un ancestro de *E. coli* B debe haber adquirido estos genes capsulares mediante transferencia horizontal. Los antígenos K localizados en la cápsula de *E. coli* se asocian frecuentemente con un fenotipo patógeno en cepas que albergan la forma funcional de los genes. Se ha mostrado que en *E. coli* B BL21, la región 2 del complejo génico de genes capsulares del grupo II se ha vuelto inactiva debido a un elemento de inserción (IS1), que evita la producción del antígeno, mientras que las regiones 1 y 3 que favorecen la exportación y la presentación de antígeno capsular de tipo silvestre, están todavía intactas [Andreishcheva et al. Gen (2006) 384: 113-119]. Sin embargo, existe una posibilidad teórica de que se vuelva a establecer un complejo génico funcional de genes capsulares del grupo II, por ejemplo, si el IS1 en la región 2 se pierde y por lo tanto se puede restablecer el complejo génico del grupo II. Alternativamente, si la región mutada IS1 se intercambia con una región 2 exógena de tipo silvestre, también se puede restablecer el complejo génico del grupo II.

30 La presente invención proporciona una cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) con una inactivación (KO, del inglés "knock out") permanente del complejo génico de genes capsulares del grupo II, con lo que esta cepa está en la misma clase de seguridad que otras cepas comercialmente importantes, tales como *E. coli* K-12.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* B BL21 caracterizada por tener al menos un 25% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente mediante delección, y que comprende un vector de expresión con una secuencia de ADN insertada que codifica un péptido.

40 En una realización, la cepa de *E. coli* B BL21 se caracteriza porque tiene una delección total o parcial del complejo de genes capsulares del grupo II.

En una realización, la cepa de *E. coli* B BL21 se caracteriza porque tiene una delección total del complejo de genes capsulares del grupo II.

En una realización, la cepa de *E. coli* B BL21 se caracteriza porque tiene una delección parcial del complejo de genes capsulares del grupo II.

En una realización adicional, la cepa de *E. coli* B BL21 se caracteriza porque tiene una o varias mutaciones puntuales en el complejo de genes capsulares del grupo II.

En otra realización, la cepa de *E. coli* se caracteriza porque tiene al menos un 40% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.

- 5 En otra realización, la cepa de *E. coli* se caracteriza porque tiene al menos un 55% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.

En otra realización, la cepa de *E. coli* se caracteriza porque tiene de un 75% a un 100% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.

- 10 En otra realización, la cepa de *E. coli* se caracteriza porque tiene al menos un 85% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.

En otra realización, la cepa de *E. coli* se caracteriza porque tiene al menos un 95% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.

En una realización, se deleciona el 30% del complejo de genes capsulares del grupo II.

En otra realización, se deleciona el 50% del complejo de genes capsulares del grupo II.

- 15 En otra realización, se deleciona el 70% del complejo de genes capsulares del grupo II.

En otra realización, se deleciona el 80% del complejo de genes capsulares del grupo II.

En otra realización, se deleciona el 90% del complejo de genes capsulares del grupo II.

En una realización, la cepa de *E. coli* es *E. coli* B BL21 (DE3) y en una realización adicional, la cepa de *E. coli* es *E. coli* B BL21(DE3) Δ dadX Δ alr.

- 20 La invención también se refiere a un método para producir un péptido que comprende cultivar en un medio de cultivo adecuado, una cepa de *E. coli* B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, seguido por el aislamiento y la purificación del péptido expresado mediante una técnica bien conocida.

- 25 En una realización, la presente invención también contempla un método para la producción de un péptido que comprende el cultivo de una cepa de *E. coli* B de acuerdo con la presente invención, en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones para la expresión del ADN que codifica dicho péptido. El péptido que se va a expresar a través del vector de expresión puede ser cualquier péptido que se puede expresar en *E. coli*. Ejemplos representativos de tales péptidos son hGH, péptidos similares al glucagón, interleucinas, análogos de insulina, adiponectina de tipo silvestre, FGF-21, tripsina, aprotinina, amilina y leptina y sus análogos, así como enzimas tales como sialidasa, transglutaminasa (tGasa), proteasa 3C de RVH (rinovirus humano), proteasa del virus del grabado del tabaco (VGT) y sus variantes.
- 30

En una realización, el péptido que se va a producir es hGH.

En otra realización, el péptido que se va a producir es FGF-21.

En otra realización, el péptido que se va a producir es amilina.

En otra realización, el péptido que se va a producir es leptina.

- 35 En otra realización, el péptido que se va a producir es sialidasa.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Fig. 1 muestra la organización genética del complejo de genes capsulares de *E. coli* B BL21 (DE3) con regiones flanqueantes no codificantes. Marcos de lectura abierta (ORFs) del complejo de genes capsulares de *E. coli* B BL21 (DE3) (flechas grandes); dirección de la transcripción (puntas de flecha): genes de la región 1 (flechas grises); ORFs de la región 2 (flechas negras); genes de la región 3 (flechas blancas); elemento IS1 (rectángulo blanco). [Andreishcheva et al. Gen (2006) 384: 113-119]. Las flechas pequeñas indican la posición del brazo izquierdo no codificante (LA) y del brazo derecho (RA).
- 40

- La Fig. 2 es una representación esquemática del flujo de trabajo del método de inactivación del complejo de genes capsulares del grupo II: a) sustitución del complejo de genes capsulares del grupo II por un gen de resistencia a antibiótico y b) eliminación del gen de resistencia a antibiótico.
- 45

La Fig. 3 muestra la detección por PCR de candidatos inactivados. El tamaño adecuado de 1686 pb (LA+parte de cat, A1-A3 en el panel superior, B1-B3 en el panel inferior) y 1578 pb (RA+parte de cat, A1-A3 en el panel superior, B1-B3 en panel inferior) amplificados a partir de candidatos inactivados (pero no su cepa parental) (BL o D) indican

una inactivación con éxito del complejo de genes del grupo II. Para el control negativo, solo la cepa parental tiene una banda con un tamaño de aproximadamente 3 kb, pero no la cepa con el grupo II inactivado. BL distintivo para la cepa BL21 (DE3), D distintivo para la cepa BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr. A1-A3 son diferentes números de colonias de candidatos inactivados de BL21 (DE3) y B1-B3 son candidatos inactivados de la cepa BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr.

- 5 La Fig. 4 es una comparación del crecimiento de cepas hospedadoras de *E. coli* B en matraz de agitación. Los símbolos utilizados se refieren a las siguientes cepas: ●, BL21 (DE3); □, BL21(DE3) Δ (kpsM-kpsF); -, BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr; Δ , BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF).

La Fig. 5 muestra la curva de crecimiento en fermentación para las diferentes cepas de *E. coli* B. Los símbolos utilizados se refieren a las siguientes cepas: ◆, BL21 (DE3); □, BL21(DE3) Δ (kpsM-kpsF); -, BL21(DE3)/pNNC1-g; ○, BL21(DE3) Δ (kpsM-kpsF)/pNNC1-g.

La Fig. 6 muestra una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) de la expresión de hGH con diferentes tiempos de inducción: a) expresión en *E. coli* B BL21 (DE3)/pNNC1-g y b) expresión en *E. coli* B BL21 (DE3) Δ (kpsM-kpsF)/pNNC1-g. Tanto en a) como en b), las pistas 1-3 muestran diferentes concentraciones de hGH: 5 μ g, 2,5 μ g y 1,25 μ g, respectivamente. La pista 4 muestra la expresión de hGH antes de la inducción y las pistas 5-14 muestran la expresión de hGH con diferentes tiempos de inducción de 1-10 horas, cada hora. Todas las muestras se normalizaron a la misma DO de carga.

La Fig. 7 muestra el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* B antes y después de la inducción de la expresión de hGH. Los símbolos utilizados se refieren a las siguientes cepas: ◆:

- BL21(DE3) Δ dadX Δ alr/pNNC1-1h; □: BL21 Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF)/pNNC1-1h; Δ ,
20 BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr/pNNC1-1h inducida; -, BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF)/pNNC1-1h inducida.

La Fig. 8 muestra la expresión de hGH analizada por SDS-PAGE en diferentes tiempos de inducción: a) *E. coli* B BL21(DE3) Δ dadX Δ alr /pNNC1-1h; b) *E. coli* B

BL21(DE3) Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF) /pNNC1-1h. Tanto en las pistas a) como b), 1-3 muestran expresión de hGH a diferentes concentraciones, 5 μ g, 2,5 μ g y 1,25 μ g, respectivamente. La pista 4 muestra la expresión de hGH antes de la inducción y las pistas 5-13 muestran la expresión de hGH con tiempos de inducción de 1-9 horas, cada hora. Todas las muestras se normalizaron a la misma DO de carga.

La Fig. 9 muestra la curva de crecimiento de *E. coli* B BL21(DE3) Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF) /pNNC1 a.23 en una fermentación de alta densidad celular en medio FDM1-2. La expresión de hGH mutante, MEAE-hGH(L101C), se indujo mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM cuando la densidad celular alcanzó una DO₆₀₀ de 70 y se continuó cultivando a 25°C. La densidad celular final alcanzó aproximadamente una DO₆₀₀ de 100 después de una inducción de 8 horas.

La Fig. 10 muestra la expresión de MEAE-hGH(L101C) durante una fermentación con alta densidad celular. Pista 1: marcador; pistas 2-4: hGH purificada como patrón a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 μ g, respectivamente; pistas 5-13: muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo después de haber sido inducidas durante 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 horas, respectivamente. La flecha indica la proteína diana, MEAE-hGH(L101C).

La Fig.11 muestra un análisis con SDS-PAGE de muestras de fermentación de la expresión de la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* en *E. coli* B BL21(DE3) Δ (kpsM-kpsF). Pista 1: marcador; pista 2: pre-inducción, homogeneizado; pista 3: post-inducción, homogeneizado; pista 4: muestra final, homogeneizado; pista 5: pre-inducción, fracción insoluble; pista 6: post-inducción, fracción insoluble; pista 7: muestra final, fracción insoluble; pista 8: pre-inducción, fracción soluble; pista 9: post-inducción, fracción soluble; pista 10: muestra final, fracción soluble; pistas 11-12: patrón de sialidasa (150 y 300 mg/l). Todas las muestras se diluyeron 10 veces.

La Fig. 12 muestra la expresión de FGF21, amilina y leptina, todos procedentes de *H. sapiens* en *E. coli* B BL21 DE3 y en *E. coli* B BL21 DE3 Δ (kpsM-kpsF). Pista 1: marcador; pistas 3-8: expresión en BL21 DE3; pistas 9-14: expresión en BL21 DE3 Δ (kpsM-kpsF); pistas 3 y 9: sin inducir; pistas 4 y 10: FGF21 inducido; pistas 5 y 11: no inducidas; pistas 6 y 12: amilina inducida; pistas 7 y 13: no inducidas; pistas 8 y 14: leptina inducida.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* B BL21 caracterizada porque tiene al menos un 25% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente mediante delección, y comprende un vector de expresión con una secuencia de ADN insertada que codifica un péptido.

50 El deterioro o la inactivación del complejo de genes capsulares del grupo II de la cepa de tipo silvestre o cualquier otra cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) se puede realizar por cualquier técnica adecuada, incluyendo la delección de todo el complejo o de una parte del mismo, o mediante una o varias mutaciones puntuales en el complejo génico.

La cepa de *E. coli* de la presente invención tiene la ventaja de proporcionar un procedimiento con un rendimiento

mejor y elevado para la producción de péptidos, en comparación con las cepas comúnmente utilizadas en la industria, tales como *E. coli* K-12.

La cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) utilizada en la presente invención puede tener una inactivación doble (2xKO) como se describe en el documento WO2008/025744. Esta cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) tiene una delección de 2 genes, *alr* y *dadX*, en donde ambos codifican la racemasa de D,L-alanina. Esta cepa con doble inactivación no puede crecer sin la adición de D-alanina al medio de crecimiento o sin la presencia de uno de los genes de racemasa en un plásmido, que puede suministrar la D-alanina necesaria. Esta cepa de *E. coli* 2xKO auxotrófica para D-alanina, denominada en este documento *E. coli* B BL21 (DE3) $\Delta alr\Delta dadX$, permite un procedimiento de selección no antibiótico para la conservación de plásmidos en las células.

En una realización de la presente invención, uno o varios genes dentro del complejo de genes capsulares del grupo II de la cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) de tipo silvestre o *E. coli* B BL21 (DE3) $\Delta alr\Delta dadX$ están delecionados. La cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) está descrita por Studier y Moffat, [J. Mol. Biol. (1986) 189:113-130] y Studier et al. [Methods in Enzymology (1990) 185:60-89] y está disponible en Stratagene y Novagen.

En una realización de la presente invención, se delecionan uno o varios genes dentro del complejo de genes capsulares del grupo II de *E. coli* B BL21 (DE3) de tipo silvestre. En otra realización de la presente invención, se delecionan uno o varios genes dentro del complejo de genes capsulares del grupo II de *E. coli* B BL21 (DE3) $\Delta alr\Delta dadX$.

En otra realización, el gen o genes seleccionados para la delección dentro del complejo de genes capsulares del grupo II son los responsables de una patogenicidad potencial. La delección de todo el complejo de genes capsulares del grupo II de 16 kb proporciona la prevención de un establecimiento potencial de nuevo del fenotipo capsular patógeno. La Figura 1 muestra los genes implicados en el complejo de genes capsulares del grupo II de cepas capsulares que incluye los genes de la región 1 *kpsFEDUCS*, la región 2 ORF1-4 y la región 3 *kpsM* y *kpstT*. Cualquiera de estos genes o combinaciones de los mismos se pueden delecionar.

La delección total del complejo de genes capsulares del grupo II, significa la delección de las 3 regiones, es decir, $\Delta(kpsM-kpsF)$. Las cepas de *E. coli* B obtenidas son *E. coli* B BL21 (DE3) $\Delta(kpsM-kpsF)$ y *E. coli* B BL21(DE3) $\Delta alr\Delta dadX \Delta(kpsM-kpsF)$.

Las bacterias son organismos haploides, es decir, tienen un solo cromosoma, por lo general, la recombinación se produce solo cuando se recoge un nuevo ADN del entorno, por ejemplo, a través de una transformación. Además, las bacterias no se pueden transformar fácilmente con ADN lineal, por ejemplo, a causa de exonucleasas intracelulares que degradan el ADN lineal. Sin embargo, mutantes competentes para la recombinación que carecen de exonucleasas del complejo de recombinación, se pueden transformar con ADN lineal. Las recombinasas son enzimas que catalizan reacciones de recombinación naturales y se ha mostrado que λ Red muestra una tasa de recombinación mejorada, en comparación con otros sistemas de recombinación. El método para la delección del complejo de genes capsulares del grupo II de la cepa de la presente invención puede estar basado en la tecnología de recombinación mediada por Red, desarrollada por Datsenko y Wanner [(2000) PNAS 97 (12): 6640-6645] u otras metodologías convencionales.

La Figura 2 muestra una vista esquemática de cómo delecionar el complejo de genes capsulares del grupo II de 16 kb de una cepa de la presente invención. En una realización, la primera etapa en el método es la sustitución del complejo de genes capsulares del grupo II de 16 kb por un marcador de selección que se genera por PCR, utilizando cebadores con extensiones o regiones de homología de nucleótidos, RA y LA (véase la Fig. 1). Esto se logra mediante recombinación mediada por Red en estas extensiones de homología flanqueantes. Después de la selección, la segunda etapa en este método es la eliminación del marcador de selección mediante el uso de un plásmido auxiliar que expresa la recombinasa FLP, que actúa sobre los sitios FRT (diana de reconocimiento de FLP) repetidos directamente que flanquean el marcador de selección. Red y los plásmidos auxiliares FLP se eliminan mediante el crecimiento a 37°C, ya que son replicones sensibles a la temperatura. La tercera etapa incluye la confirmación de la delección mediante análisis con PCR.

La transformación bacteriana se puede denominar un cambio genético estable provocado por la captación de ADN y la competencia se refiere al estado de ser capaz de captar ADN exógeno. Algunas bacterias tienen la capacidad natural de captar ADN en condiciones de laboratorio y tales especies son portadoras de conjuntos de genes que especifican la maquinaria para transportar el ADN a través de la membrana o membranas de la célula, mientras que otras se tienen que inducir por procedimientos de laboratorio en los que las células se vuelven permeables al ADN de forma pasiva, usando condiciones que normalmente no se producen en la naturaleza. El enfriamiento de las células en presencia de cationes divalentes tales como Ca^{+2} (en $CaCl_2$) prepara las paredes celulares para volverse permeables al ADN de plásmido. Las células se incuban sobre hielo con el ADN y luego reciben brevemente un choque térmico (por ejemplo, 42°C durante 30-120 segundos), lo que hace que el ADN entre en la célula y es un método bien conocido en la técnica [Sambrook et al., A Laboratory Manual (1989) CSH]. La electroporación es otra manera de crear agujeros en células bacterianas (y otros tipos), sometiendo brevemente a un campo eléctrico en el intervalo de kV. El ADN del plásmido puede entrar en la célula a través de estos agujeros. Este método se puede emplear con ADN plasmídico de gran tamaño. Los mecanismos naturales de reparación de membranas cerrarán rápidamente estos agujeros después de la ruptura. Con el fin de persistir y estar mantenida de manera estable en la

célula, una molécula de ADN de plásmido debe contener un origen de replicación, que le permita replicarse en la célula independientemente del cromosoma.

5 Cuando se emplea cualquiera de las metodologías de inactivación de genes descritas en este documento, cualquier inactivación dirigida de parte o de todo el complejo de genes capsulares del grupo II se detecta mediante un marcador de selección, de modo que el clon modificado de la cepa de *E. coli* B BL21 se puede identificar y aislar.

El marcador de selección puede ser cualquier gen marcador adecuado, tal como un gen de resistencia a antibiótico o un marcador auxotrófico.

10 Los genes de resistencia a antibiótico adecuados son cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, vancomicina y eritromicina o cualquier otro representante de las β -lactamas, los aminoglucósidos, los glicopéptidos o los antibióticos macrólidos.

15 El término "clonación" tal como se utiliza en esta memoria, implica realizar múltiples copias idénticas de una secuencia de ADN. La secuencia de ADN diana se inserta entonces en un vector de clonación. Debido a que este vector se origina a partir de un virus auto-replicante, un plásmido o un organismo celular más desarrollado, cuando se inserta el ADN de tamaño apropiado, los "fragmentos de ADN diana y del vector se ligan a continuación" y crean una molécula de ADN recombinante. Las moléculas de ADN recombinante se colocan entonces en una cepa bacteriana (generalmente *E. coli*) que produce muchas copias idénticas después de la transformación. La transformación es el mecanismo de captación de ADN que tienen las bacterias. Sin embargo, solo una molécula de ADN recombinante con un origen de replicación dado se puede establecer dentro de una célula bacteriana aislada, por lo que cada clon alberga solo un inserto de ADN.

20 El término "inactivación" tal como se emplea en esta memoria, significa una cepa bacteriana modificada genéticamente en la que uno o varios genes se han deletado o inactivado (han sido "expulsados" del organismo). Organismos inactivados se utilizan normalmente como modelos para estudiar el papel de genes que se han secuenciado, pero tienen funciones desconocidas. Las técnicas de inactivación se pueden utilizar para eliminar genes no deseados y/o potencialmente patógenos de organismos de interés.

25 La expresión "complejo de genes", tal como se usa en este documento, significa un conjunto de dos o varios genes que están acoplados genética y funcionalmente. Dado que las poblaciones procedentes de un ancestro común tienden a poseer variedades de los mismos complejos de genes, son útiles para realizar un seguimiento de la historia evolutiva reciente.

30 La expresión "cepa parental" puede ser cualquier cepa bacteriana a partir de la que se obtiene la cepa con el genoma reducido. Ejemplos representativos de cepas parentales de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cepas de *E. coli* tales como B o C, o una cepa con una secuencia del genoma sustancialmente idéntica a las mismas.

35 Los términos "nivel" o "cantidad" de péptido producido en una célula hospedadora bacteriana dada, tal como se usa en el presente documento, se pueden referir a una medida cuantitativa de péptido presente o detectable, de acuerdo con el método de producción seleccionado, en el cultivo celular. Por ejemplo, si el método de producción de péptido seleccionado da lugar a una acumulación de péptido dentro de la propia célula, entonces el nivel o la cantidad de péptido producido será la medida cuantitativa de péptido presente en las propias células. Si el método de producción de péptido implica la secreción del péptido, entonces el nivel de producción de péptido será la medida cuantitativa de péptido presente en el medio de crecimiento.

40 El término "rendimiento" de péptido, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad cuantitativa de un péptido esencialmente puro, en donde dicho péptido se recupera y/o se purifica esencialmente exento de péptidos asociados naturalmente con la cepa hospedadora. En la determinación de un "rendimiento" cuantitativo o una "cantidad" de péptido producido por una célula hospedadora bacteriana, tal como las cepas de *E. coli* B BL21, se pueden emplear métodos convencionales específicos de péptido tales como inmunoensayo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), actividad enzimática, técnicas espectrofotométricas, SDS-PAGE y similares.

45 La expresión "secuencia de control de la expresión" empleada en el presente documento, significa un promotor o una variedad de sitios que se unen al factor de transcripción, que dirigen la transcripción de un ácido nucleico ligado funcionalmente a los mismos.

50 La expresión "extremo libre" empleado en referencia a un ácido nucleico bicatenario, puede significar un ácido nucleico lineal con extremos romos libres o extremos cohesivos libres, o una combinación de los mismos.

55 El término "gen" utilizado en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido o un precursor del mismo. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificadora de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificadora, siempre que se conserve la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, antigenicidad etc.) de la longitud completa o del fragmento. El término también incluye las secuencias localizadas de forma adyacente a la región codificadora, tanto en el extremo

5' como 3' que contribuyen a que el gen sea transcrito en un ARNm de longitud completa. El término "gen" incluye tanto ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o un clon de un gen puede contener la región codificadora interrumpida con secuencias denominadas no codificadoras (por ejemplo, intrones).

5 Los términos "introducir" o "introducido", cuando se emplean en referencia a la adición de un ácido nucleico a una cepa, significan que el ácido nucleico se puede integrar en el cromosoma de la cepa o puede estar contenido en un vector, tal como un plásmido, en la cepa.

Las expresiones "marco de lectura abierto" u "ORF" tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una secuencia genética que no contiene codones de parada.

10 Los términos "péptido", "polipéptido" o "proteína" se utilizan indistintamente en este documento y significan un péptido, un polipéptido y una proteína, natural o recombinante, así como fragmentos, derivados, homólogos, variantes y fusiones de los mismos.

15 El crecimiento de cepas con el grupo II inactivado se evaluó en matraces de agitación y en fermentadores de alta densidad y se comparó con sus cepas parentales. Los experimentos mostraron que la inactivación del grupo II no afecta al crecimiento de las células, en ningún fondo de cepa. Un vector de expresión que albergaba diversos péptidos se transformó en las cepas con el grupo II eliminado, para pruebas de expresión en un fermentador de alta densidad.

20 En una realización, los péptidos para producción en las cepas de *E. coli* B de la presente invención se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste, pero no se limita a hGH, péptidos similares al glucagón, interleucinas, análogos de insulina, adiponectina de tipo silvestre, FGF-21, tripsina, aprotinina, amilina y leptina y sus análogos. Enzimas tales como sialidasa, transglutaminasa (tGasa), proteasa 3C de RVH (rinovirus humano), proteasa del virus del grabado del tabaco (VGT) y sus variantes, y cualquier otro péptido o un péptido para el cual un sistema de expresión es funcional en *E. coli*.

25 La presente invención también se refiere a un método de preparación de péptidos humanos como se ha mencionado anteriormente. En general, una secuencia clonada de ácido nucleico de un péptido de tipo silvestre, se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta entonces en un vector de expresión, que a su vez se transforma o se transfecta en células hospedadoras. Sistemas de expresión funcionales incluyen típicamente los componentes convencionales de una expresión génica descritos por Studier y Moffat [J. Mol. Biol. (1986) 189:113-130] y Studier et al. [Methods in Enzymology (1990) 185:60-89].

30 Los péptidos que se van a producir en las células hospedadoras se pueden sintetizar como péptidos de fusión, secretar en los medios o en el espacio periplásmico, producir de forma libre en el citoplasma o acumular en cuerpos intracelulares tales como cuerpos de inclusión. La purificación de los péptidos implica de manera similar el uso de metodologías convencionales mencionadas anteriormente que están disponibles al público, que están adaptadas al péptido de interés otra vez mediante técnicas convencionales.

La presente invención es adecuada para la producción de cualquier tipo de péptido.

35 En una realización, el péptido seleccionado para la producción en las células hospedadoras de *E. coli* B BL21 con el grupo II inactivado, es la hormona de crecimiento humana (hGH) y en una realización, la hormona de crecimiento humana (hGH) se produce a partir de un péptido precursor, tal como el descrito en el documento EP217814 que describe cómo preparar hGH a partir de un precursor de hGH.

40 En una realización adicional, la hormona de crecimiento es MEAE(SEQ ID 16)-hGH(L101C), que es un precursor de un análogo de hGH, en el que la leucina en la posición 101 en la molécula de hGH está sustituida por cisteína.

En otra realización, el péptido similar al glucagón es GLP-1, GLP-1 y/o derivados de los mismos.

45 La expresión "péptido similar al glucagón" tal como se emplea en el presente documento, significa la familia de péptidos del glucagón, exendinas y análogos de los mismos. La familia de péptidos del glucagón está codificada por el gen de preproglucagón e incluye tres péptidos pequeños con un alto grado de homología, es decir, glucagón (1-29), GLP-1 (1-37) y GLP-2 (1-33). Las exendinas son péptidos expresados en lagartos y, al igual que el GLP-1, son insulino-trópicos. Ejemplos de exendinas son exendina-3 y exendina-4.

50 La expresión "análogo de péptido similar al glucagón" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido similar al glucagón modificado, en el que uno o varios residuos de aminoácidos del péptido similar al glucagón han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en el que uno o varios residuos de aminoácidos han sido delecionados del péptido similar al glucagón y/o en el que uno o varios residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido similar al glucagón. Tal adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en cualquier posición del péptido.

PARTE EXPERIMENTAL

Para la preparación de reservas en glicerol de las cepas, una sola colonia se transfirió a un tubo de ensayo de 12 ml

que contenía 2 ml de medio LB con los antibióticos apropiados y se cultivó a 37°C, con agitación a 220 rpm durante 2 horas.

5 Para la preparación del inóculo de la fermentación, las células de una reserva en glicerol se sembraron en placas de LB con y sin adición de ampicilina. Las células después de una noche se lavaron con medio LB y se inocularon en matracas de agitación de 500 ml que contenían cada uno 100 ml de medio complejo de fermentación con la concentración adecuada de antibiótico y se cultivaron a 37°C con agitación a 220 rpm durante 3-4 horas. Las células se inocularon a continuación en el reactor a una concentración de DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5.

10 Las fermentaciones se llevaron a cabo en condiciones aerobias en un biorreactor de 5 l con un volumen inicial de medio complejo de fermentación de 2,5 l, con los antibióticos apropiados. A tiempo cero, el reactor se inoculó a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. El pH se mantuvo a 7,0 con NH₃ 5 N y H₂SO₄ y un caudal de aire constante de 6 ml/min se burbujeó a través del cultivo durante el periodo de fermentación. La temperatura se mantuvo a 37°C. La agitación se controló por cascada mediante el mantenimiento del nivel de oxígeno disuelto hasta un 20% de O₂ saturado.

15 Un experimento por lotes alimentado se realizó para comparar el crecimiento y la expresión del péptido de la cepa con el grupo II eliminado, con su cepa parental en un fermentador de alta densidad. El fermentador se cargó con medio complejo complementado con 27 g/l de glicerol. A tiempo cero, el fermentador se inoculó a una DO₆₀₀ de 0,5. El glicerol y el extracto de levadura se añadieron continuamente en etapas crecientes a medida que se consumía el glicerol básico, lo que estaba indicado por un incremento en el oxígeno disuelto. Las muestras para la determinación de la DO₆₀₀ y la expresión de la proteína se recogieron del fermentador y se analizaron mediante espectrofotometría y SDS-PAGE.

20 La inducción de la expresión de proteínas en bacterias es bien conocida en la técnica. En la presente invención, la inducción de la expresión de proteínas se realiza mediante adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

25 Los plásmidos y las cepas utilizadas en ciertas realizaciones de la invención se enumeran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. La construcción de los plásmidos se realizó utilizando técnicas de biología molecular convencionales, como se describe en Sambrook et al. [A Laboratory Manual (1989) CSH].

Tabla 1. Plásmidos utilizados en los ejemplos

Plásmido	Genotipo	Origen
pKD46	Amp ^R	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
pCP20	Amp ^R Cm ^R	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
pEZ-T	Clonación del vector Amp ^R	GenStar
pGEM-T	Clonación del vector Amp ^R	Promega
pNNC1-g (pET11d-MEAE-hGH)	Expresión del vector Amp ^R que expresa MEAE-hGH	Basado en pET 11 d de Novagen
pNNC1-1h (pET11d-MEAE-hGH, <i>alr</i> (promotor y secuencia codificadora de <i>alr</i>))	Expresión del vector <i>alr</i> que expresa MEAE-hGH y racemasa de D,L-alanina	Basado en pET 11 d de Novagen

Tabla 2. Cepas empleadas en los ejemplos

Cepa	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm (DE3)	Novagen
BL21 (DE3)Δ <i>alr</i> Δ <i>dadx</i>	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm (DE3)Δ <i>alr</i> Δ <i>dadx</i>	WO2008/025744
BL21 (DE3)Δ(<i>kpsM-kpsF</i>):: <i>cat</i>	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm(DE3)Δ(<i>kpsM-kpsF</i>):: <i>cat</i>	Presente invención
BL21 (DE3)Δ <i>dadX</i> Δ <i>alr</i> Δ(<i>kpsM-kpsF</i>):: <i>cat</i>	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm(DE3)Δ <i>alr</i> Δ <i>dadx</i> Δ(<i>kpsM-kpsF</i>):: <i>cat</i>	Presente invención
BL21 (DE3)Δ(<i>kpsM-kpsF</i>)	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm(DE3)Δ(<i>kpsM-kpsF</i>)	Presente invención
BL21 (DE3) Δ <i>dadX</i> Δ <i>alr</i> Δ(<i>kpsM-kpsF</i>)	F-ompThsdS _B (rB-mB-)gal dcm(DE3)Δ <i>alr</i> Δ <i>dadx</i> Δ(<i>kpsM-kpsF</i>)	Presente invención

Tabla 3. Lista de cebadores empleados para llevar a cabo la invención

NOMBRE DEL CEBADOR	CONSENSO 5' A 3' (ADN BICATENARIO)
LA_BL_GII_F	<u>SacII</u> +LA
	TCCTT <u>ACCGCGGGTCAAACCCGCTTACCGGGC</u> (SEQ ID 1)
LA_BL_GII_R	<u>EcoRI</u> +LA abajo
	CTACCGGAATTCTTGATGATGTGATCCTAATCTC (SEQ ID 2)
RA1_BL_GII_F	BamHI+RA1
	TTC <u>GATCCATCAGCTCCTT</u> GCACGGAA (SEQ ID 3)
RA1_BL_GII_R	SacI+RA1 abajo
	GAACGAGCTC <u>CACACTCCCGAATCATCAATA</u> (SEQ ID 4)
RA_SEQ_R1	GCACCACTAATTCTTAAGAACCCGCCACAAG (SEQ ID 5)
LA_SEQ_F1	ACTGGAATTTGGACGGGGGTAGGTATTGCC (SEQ ID 6)
LA_SEQ_F2	TTGATGTCAGTGCTGCTGAGAAGCCTGGGATG (SEQ ID 7)
Cat_SEQ_F	CGACGATTTCCGGCAGTTTCTAC (SEQ ID 8)
CAT_ID_R	GCCAGGTTTTACCGTAACACGCC (SEQ ID 9)
RA6_BL_GII_F	BamHI+RA6
	CCTGTGGATCC <u>CAGAACGTTGTTG</u> (SEQ ID 10)
RA6_BL_GII_R	SacI+RA6 abajo
	GAACGAGCTC <u>CATGTTGATAAAAAGTGAAGTC</u> (SEQ ID 11)

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción del casete de sustitución

- 5 La cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) se utilizó como fuente de ADN para la amplificación por PCR. Los cebadores oligonucleótidos (LA_BL_GII_F/LA_BL_GII_R) (Tabla 3) se sintetizaron, se dirigieron a una región de 1001 pb aguas arriba del extremo 5' del sitio de clonación SacII/EcoRI que contenía *KpsM*. Esta región se amplificó a partir del ADN genómico como brazo izquierdo (LA). Para el brazo derecho (RA), se sintetizaron cebadores oligonucleótidos (RA1_BL_GII_F/RA1_BL_GII_R) (Tabla 3), dirigidos a una región de 1108 pb aguas arriba del extremo 5' del sitio de clonación BamHI/SacI que contenía *KpsF*. Se generaron productos de PCR del brazo izquierdo y del brazo derecho. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un ciclador térmico, usando un programa que incluía los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C durante 50 s, reasociación a 57°C durante 60 s y extensión del cebador a 72°C durante 60 s, durante un total de 30 ciclos. El producto de la amplificación con PCR con el tamaño de banda correcto, se observó por electroforesis en gel, sobre un gel de agarosa al 1%, a partir del cual se extrajeron 50 µl del producto amplificado y se utilizaron para construir un fragmento de sustitución. Una lista de secuencias de oligonucleótidos se muestra en la Tabla 3.

- El brazo izquierdo amplificado se purificó en gel y se ligó en el plásmido pEZ-T, dando como resultado el plásmido pEZ-T-LA. Las enzimas de restricción EcoRI/BamHI digirieron el fragmento FRT-cat-FRT que se ligó en el sitio EcoRI/BamHI de pEZ-T-LA, dando como resultado el plásmido pEZ-T-LA-FRT-cat-FRT. El brazo derecho amplificado se ligó en el plásmido pGEM-T y se digirió con BamHI/SacI. El fragmento de ADN digerido con BamHI/SacI, que es portador de un gen de resistencia a ampicilina, se ligó en el plásmido pEZ-T-LA-FRT-cat-FRT. El gen de resistencia al cloranfenicol proporciona un marcador seleccionable para identificar el fragmento de sustitución. El plásmido resultante pEZ-T-LA-FRT-cat-FRT-RA, se utilizó para producir una cepa BL21 (DE3) inactivada.

Ejemplo 2: Producción de una cepa BL21 (DE3) inactivada

- 25 *E. coli* BL21 (DE3) se cultivó en medio LB durante una noche a 37°C y las células de BL21 (DE3) competentes para choque térmico se prepararon por métodos convencionales. El plásmido pKD46 se transformó en células BL21 (DE3) competentes y las células transformadas se cultivaron hasta una DO_{600 nm} de 0,4 en medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina a 30°C. La expresión de la recombinasa Red fue inducida por L-arabinosa (concentración final de 1 mmol/l) durante una hora.
- 30 Para el complejo de genes del grupo II inactivado, 500 ng del fragmento de sustitución, amplificado a partir de pEZ-T-LA-FRT-cat-FRT-RA se transfirieron a células BL21 (DE3) competentes mediante electroporación. Las células competentes para electroporación se prepararon por métodos convencionales. La recuperación de las células se

llevó a cabo a 30°C durante 1,5 horas. Las células se sembraron en placas sobre agar LB complementado con 8 µg/ml de cloranfenicol. Las colonias resistentes al cloranfenicol de BL21 (DE3)Δ*kpsM-kpsF*::*cat* se formaron después de incubar durante una noche a 30°C.

5 Para garantizar la inactivación completa del complejo de genes del grupo II en la posición correcta del cromosoma, se diseñaron cebadores oligonucleótidos con homología con la parte exterior de los brazos izquierdo y derecho del complejo de genes del grupo II. A falta de las secuencias flanqueantes de *E. coli* B BL21 (DE3) de la parte exterior de las 18 kb, la secuencia publicada de *E. coli* 536 (nº de orden CP 000247.1) se utilizó para el diseño de los cebadores de detección para la PCR, suponiendo una ubicación similar del complejo de genes del grupo II en los 2 genomas, basándose en una homología elevada en las regiones flanqueantes próximas. Se sometieron a ensayo tres colonias resistentes al cloranfenicol para estudiar la sustitución de genes.

La prueba del fenotipo de las colonias resistentes al cloranfenicol se realizó mediante crecimiento en LB+Cm (25 µg/ml) durante al menos dos generaciones. Todas las colonias resistentes al cloranfenicol podían crecer muy bien en medio LB+Cm (25 µg/ml). Las cepas auxotróficas para D-alanina resistentes al cloranfenicol también se sometieron a ensayo en el mismo procedimiento, con administración de suplementos de D-alanina.

15 Una sustitución con éxito fue confirmada por bandas de 1686 pb y 1578 pb.

Los cebadores oligonucleótidos (LA_SEQ_F1/Cat_ID_R) se utilizaron para amplificar una banda que contenía el brazo izquierdo y parte del gen *cat* (tamaño 1686 pb), y los cebadores oligonucleótidos (RA_SEQ_R1/Cat_SEQ_F) se utilizaron para amplificar una banda que contenía el brazo derecho y parte del gen *cat* (tamaño 1578 pb). Para tres colonias resistentes al cloranfenicol, el tamaño correcto de las bandas indicaba que el complejo de genes del grupo II de 16 kb había sido sustituido por el gen *cat* (Fig. 3). Se creó un control negativo de una banda de 3000 pb que contenía el brazo derecho incluyendo *kpsF* y parte de *kpsE*, y solo debía aparecer en la cepa de control (antes de la sustitución), pero no en la cepa resistente al cloranfenicol. Los cebadores oligonucleótidos (RA6_BL_GII_F/RA6_BL_GII_R) (Tabla 3) se utilizaron para amplificar *kpsF* y *kpsE*. Los resultados de la PCR mostraron que solo la cepa de control tenía esta banda, no la cepa resistente al cloranfenicol.

25 El mismo proceso de eliminación se aplicó a la cepa auxotrófica para D-alanina BL21(DE3)Δ*dadXΔalr*, que necesita un suplemento de D-alanina durante el crecimiento en medio LB.

Las cepas resistentes al cloranfenicol de *E. coli* B BL21(DE3)Δ(*kpsM-kpsF*)::*cat* y BL21(DE3)Δ*dadXΔalr*Δ(*kpsM-kpsF*)::*cat* se confirmaron por su fenotipo y selección por PCR, confirmando que el complejo de genes capsulares del grupo II había sido sustituido por el gen *cat*.

30 **Ejemplo 3: Eliminación del marcador de resistencia a fármacos y caracterización de la cepa con el grupo II inactivado**

Células *E. coli* BL21(DE3)Δ(*kpsM-kpsF*)::*cat* y BL21(DE3)Δ*dadXΔalr*(*kpsM-kpsF*)::*cat* procedentes de reservas congeladas se cultivaron en medio LB durante una noche a 37°C con 25 µg/ml de cloranfenicol o 25 µg/ml de cloranfenicol más D-alanina 100 mM para la segunda cepa. Las células competentes para electroporación de las dos cepas inactivadas, se prepararon por métodos convencionales. El plásmido pCP20 (Cm^R, Amp^R) se transformó en las dos cepas inactivadas competentes. La eliminación del marcador de resistencia a fármacos se llevó a cabo cultivando las células transformadas en medio SOC a 30°C durante 1 hora con agitación suave. Las colonias individuales de clones candidatos resistentes a la ampicilina sobre la placa, se seleccionaron después del cultivo durante una noche a 30°C. Los clones candidatos se cultivaron en medio LB solamente o medio LB complementado con D-alanina a 37°C durante tres horas, para eliminar el plásmido pCP20. Cinco colonias individuales, que aparecieron sobre el medio LB solamente o medio LB complementado con D-alanina, se caracterizaron adicionalmente mediante escrutinio con PCR.

Un análisis del fenotipo de las cepas con eliminación de *cat* se llevó a cabo haciendo crecer las colonias individuales en LB, LB+Cm (8 µg/ml) y LB+Amp. Todas las colonias con eliminación de *cat* solo podían crecer en medio LB. Para las cepas auxotróficas para D-alanina con *cat* eliminado, las cinco colonias podían crecer solo en medio LB con D-alanina suplementaria. Por lo tanto, el gen *cat* había sido eliminado.

Una eliminación con éxito del gen *cat* se debe confirmar con una banda de 2381 pb. Los cebadores oligonucleótidos (LA_SEQ_F2/RA_SEQ_R1) se utilizaron para amplificar una banda que contenía el brazo izquierdo y el brazo derecho. Para todas las colonias individuales, la aparición de una banda de 2381 pb indicaba que el gen *cat* había sido eliminado.

Las cepas inactivadas de *E. coli* B BL21(DE3)Δ(*kpsM-kpsF*) y B BL21(DE3)Δ*dadXΔalr*Δ(*kpsM-kpsF*) se confirmaron por su fenotipo y escrutinio con PCR. Se prepararon reservas en glicerol de ambas cepas para el almacenamiento.

Ejemplo 4: Crecimiento de las cepas hospedadoras inactivadas en matraces de agitación

55 Células *E. coli* B BL21(DE3) y B BL21(DE3)Δ(*kpsM-kpsF*) procedentes de reservas congeladas fueron cultivadas en placas de LB durante una noche a 37°C. Cantidades apropiadas de células retiradas por lavado desde placas culti-

vadas durante una noche, se inocularon en matraces de agitación de 250 ml con deflectores que contenían 25 ml de medio LB a una concentración de DO_{600} de aproximadamente 0,05. Las células se cultivaron a 37°C con agitación a 220 rpm durante 8 horas. Se tomó una muestra de cada cepa cada ½ hora de comparar el crecimiento de las células a DO_{600} .

- 5 El mismo flujo de trabajo se aplicó a *E. coli* B BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr* y B BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) complementada con D-alanina, para una comparación del crecimiento en matraz de agitación.

Los resultados en la Fig. 4 muestran que el crecimiento de BL21 Δ (*kpsM-kpsF*) a lo largo del tiempo era idéntico al de su cepa parental BL21 (DE3) en matraz de agitación utilizando medio LB. Se pudo llegar a la misma conclusión al comparar BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) con BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr*.

10 **Ejemplo 5: Comparación del crecimiento y la expresión de MEAE-hGH entre la cepa hospedadora BL21 (DE3) y BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*) en fermentación de alta densidad**

Células *E. coli* B BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*) procedentes de reservas congeladas, se cultivaron en placas de LB. Las células competentes para choque térmico de la cepa inactivada fueron preparadas por métodos convencionales. El plásmido pNNC1-g (pET11d-MEAE-hGH(Amp^R)) que contenía un casete de expresión de hGH, se transformó en células competentes B BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*), a partir de las cuales se había preparado una reserva en glicerol de células transformadas.

Las fermentaciones de alta densidad se llevaron a cabo en condiciones aerobias como se ha descrito anteriormente.

La Figura 5 muestra que el crecimiento de BL21 Δ (*kpsM-kpsF*) a lo largo del tiempo era idéntico al de su cepa parental BL21 (DE3) en fermentador de alta densidad en medio complejo. Se pudo llegar a la misma conclusión al comparar BL21(DE3) Δ (*kpsM-kpsF*)pNNC1-g con BL21(DE3)pNNC1-g. La densidad celular alcanzaba aproximadamente una DO_{600} de 140 en el estado no inducido. La expresión de hGH se llevó a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración de 1 mM cuando el crecimiento de las células alcanzó una DO_{600} de 80. Después de 10 horas de inducción con IPTG a 30°C, la densidad celular alcanzó aproximadamente una DO_{600} de 100.

E. coli B BL21(DE3)pNNC1-g y B BL21(DE3) Δ (*kpsM-kpsF*)/pNNC1-g son eficaces en la producción de hGH como se observa en SDS-PAGE. El aumento del nivel de expresión de hGH viene a continuación de un incremento del tiempo de la inducción de 1 a 10 horas, lo que se muestra en el gel de SDS-PAGE (Fig. 6). La capacidad de las dos cepas para producir hGH era idéntica, es decir, no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de hGH en la cepa hospedadora B BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*) cuando se comparó con B BL21 (DE3), que albergaba el complejo de genes II.

30 **Ejemplo 6: Comparación del crecimiento y la expresión de MEAE-hGH entre la cepa hospedadora BL21 (DE3) Δ *alr* Δ *dadX* y BL21 (DE3) Δ *alr* Δ *dadX* Δ (*kpsM-kpsF*) en fermentación de alta densidad**

Células *E. coli* B BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) procedentes de reservas congeladas se cultivaron en medio LB complementado con D-alanina. Las células competentes para choque térmico de la cepa inactivada se prepararon por métodos convencionales. El pNNC1-1h (pET11d-MEAE-hGH y *alrP-alrCD* (Amp^R)) que contenía un gen complementario de D-alanina se digirió empleando AatII/PsiI, seguido de formación de extremos romos y autoligación del plásmido, dando como resultado un plásmido *bla*- para la selección del gen *alr* en el plásmido. El plásmido pNNC1-1h (pET11d-MEAE-hGH, *alrP-alrCD*, *bla*-) se transformó en células competentes BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*). Las colonias que aparecieron durante una noche en placa de LB sin D-alanina complementaria, se aislaron para la preparación de reservas en glicerina.

40 Las fermentaciones de alta densidad se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 5.

La Figura 7 muestra que el crecimiento de *E. coli* B BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*)/pNNC1-1h a lo largo del tiempo era idéntico a su cepa parental BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr*/pNNC1-1h en un fermentador de alta densidad en medio FCM1. Se pudo llegar a la misma conclusión con inducción de hGH cuando se comparó B BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr*/pNNC1-1h con BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*)/pNNC1-1h. La densidad celular alcanzó aproximadamente una DO_{600} de 120 en el estado no inducido. La expresión de hGH se llevó a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración de 1 mM cuando el crecimiento de las células alcanzó una DO_{600} de 80. Después de 9 horas de inducción con IPTG a 30°C, la densidad celular alcanzó una DO_{600} de aproximadamente 100.

E. coli B BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr*/pNNC1-1h y B BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*)/pNNC1-1h era eficaz en la producción de hGH como se puede observar a partir de los resultados de SDS-PAGE (Fig. 8). Un aumento en el nivel de expresión de hGH viene a continuación de un incremento del tiempo de inducción. Ambas cepas tenían una capacidad idéntica para producir hGH.

50 **Ejemplo 7: Evaluación del crecimiento celular y la expresión de MEAE-hGH(L101C) usando la cepa hospedadora *E. coli* B BL21 (DE3) Δ *alr* Δ *dadX* Δ (*kpsM-kpsF*) en la fermentación con densidad celular elevada**

Células *E. coli* B BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) procedentes de reservas congeladas se cultivaron en medio

LB complementado con D-alanina. Se prepararon células competentes de esta cepa inactivada tres veces para la transformación, utilizando el método de choque térmico mediante procedimientos convencionales.

5 Para eliminar el gen de la β -lactamasa que codificaba la resistencia a ampicilina, el plásmido pNNC1a.23 (pET11d-MEAE-hGH(L101C)) que codificaba MEAE-hGH(L101C) y que contenía *alrP-alrCD* para complementar la carencia de D-alanina de la célula hospedadora, se digirió con *AatII/PsiI*, seguido de formación de extremos romos y auto-ligación para eliminar el gen de la β -lactamasa. El plásmido resultante, pNNC1a.23 (pET11d-MEAE-hGH, *alr*, *bla*^r), se transformó en la célula hospedadora, BL21(DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) mediante un método de choque térmico. Una sola colonia que creció en la placa LB sin complemento de D-alanina, se seleccionó para preparar las reservas en glicerol para almacenamiento a -80°C.

10 Dos lotes de fermentación con densidad celular elevada se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 5. El crecimiento celular se controló durante el proceso y los resultados se muestran en la Fig. 9.

15 La expresión de MEAE-hGH(L101C) a través de la cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) Δ *dadX* Δ *alr* Δ (*kpsM-kpsF*) que albergaba el plásmido pNNC1a.23, se evaluó en fermentación con densidad celular elevada. El resultado mostraba que la densidad celular en la recogida puede alcanzar hasta aproximadamente 100 medida a DO_{600 nm}, y el nivel de expresión de la proteína diana, MEAE-hGH(L101C), alcanzaba aproximadamente 7 g/l después de 8 horas de inducción, como se muestra en la Fig. 10.

Ejemplo 8: Expresión de sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* en *E. coli* BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*)

20 La sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (AUS, 53,4 kDa de masa teórica) fue producida en *Escherichia coli* BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*) con un marcador His C-terminal. El gen de la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*, con un marcador His6 en el extremo C-terminal, se clonó en el vector de expresión pET-24a (Novagen) bajo el control del promotor T7. Con el fin de producir la enzima sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*, se generó un gen optimizado con un codón sintético que codificaba la siguiente secuencia de proteína (SEQ ID 12):

```

MAPTPPNSPTLPPGSFSETNLAADRRTAANFFYRIPALTYLGNDVVLAAWDGRPGS
AADAPNPNSIVQRRSTDGGKTWGPVQVIAAGHVADASGPRYGYSDPSYIYDAEANKVFAFF
VYSKDQGFSGSQFGNDDADRNVISSAVIESSDAGVTWSQPRLITSVTKPGTSKTNPAAGDV
RSNFASSGEGIQLKYGPHKGRLIQYAGDVRQADGNSNKIQAYSVDHGVTVHWKGANVG
DRMDENKTVELSDGRVLLNSRDNANRGYRQVAVSTDGGATYGPVSQDTELPDPANNGAIA
RMFPNAAQGSADAKKLIFTNANSKTGRENV SARVSCDDGETWPGVVRTIRSGFSAYSTVTRL
ADGKFGVLYEGNYTDNMPFATFDDAWLNYVCAPLAVPAVNIAPSATQEVPTVTNQEATTL
SGATATVYTPSGWSATTVPVPDVPAGASVTVTVALTAPADASGPRSLNAAFTTADGRVRSQF
TFTATTPVAPQVGLTITGSALEHHHHHH

```

25 El gen sintético se introdujo en el vector de expresión pET-24a como un fragmento XbaI-XhoI para producir el vector de expresión de AUS, pLLC028. El vector resultante se transformó en BL21 (DE3) Δ (*kpsM-kpsF*) competente y los transformantes se conservaron en glicerol a -80°C.

30 Un criotubo del clon de la célula inicial congelada (ICC) se utilizó para inocular dos matraces de agar con medio de extracto de levadura (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de glucosa, 20 g/l de agar). El medio de agar contenía kanamicina para la selección. La incubación fue a 30°C durante 25 horas. Después de la incubación, las células se retiraron por lavado de la superficie de agar, usando solución estéril de NaCl al 0,9%. Una fermentación de 10 l se inoculó empleando un precultivo procedente de dos matraces de agar. El volumen del inóculo obtenido era de 75 ml, y la DO_{600 nm} era 4,3, lo que daba lugar a una DO_{600 nm} inicial en el fermentador de aproximadamente 0,03. La fermentación se llevó a cabo en un recipiente de acero inoxidable de 20 l con un volumen de trabajo inicial de 10 l. La fermentación se inicia con una fase por lotes de 8 horas de duración en un medio complejo que contiene 40 g/l de extracto de levadura, 15 g/l de glicerol (87%), sales y metales traza, seguida de alimentación de glicerol hasta un perfil predeterminado. Durante las primeras 17 horas, la temperatura de fermentación era de 37°C. Después de ello, la temperatura se redujo a 30°C. Después de 18 horas transcurridas de tiempo de fermentación, se añadió el inductor IPTG a 0,1 mM, con el fin de inducir la expresión de la proteína. La duración de la inducción puede ser de hasta 40 22 horas. El proceso de recuperación consiste en centrifugación, homogeneización a alta presión y microfiltración de flujo cruzado empleando casetes Sartocoon Slice con un tamaño de poro de 0,2 μ m.

45 La fermentación de AUS se analizó utilizando SDS-PAGE y un ensayo de la actividad enzimática. El análisis por SDS-PAGE reveló que la sialidasa expresada aparece tanto en la fracción soluble como en el sedimento después de una molienda con perlas. La Figura 11 muestra una fermentación típica, resultado de una ejecución por lotes de 10 l a 30°C de temperatura de inducción e IPTG 0,1 mM.

Ejemplo 9: Expresión del factor de crecimiento de fibroblastos humano 21 (FGF21) en BL21 DE3 y BL21 DE3

$\Delta(kpsM-kpsF)$

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de FGF21 humano se describen, por ejemplo, en Ni-Shimura et al. Biochim. Biophys. Acta 1492(1):203-206 (2000). Las secuencias también están disponibles en bases de datos públicas (números de orden EMBL: AB021975 y UNIPROT: Q9NSA1, respectivamente).

- 5 El polipéptido natural se sintetiza con un péptido señal (en cursiva a continuación) de 28 aminoácidos para la secreción, mientras que el polipéptido de FGF21 maduro consiste en los 181 aminoácidos restantes (SEQ ID 13):

MDSDETGF^{EH}SGLWVSVLAGLLL^{GACQAHP}IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHF
DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPA-
LPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPS QGRSPSYAS

10 El polipéptido de FGF21 maduro se clonó y se expresó como una proteína intracelular en *E. coli*, sin el péptido señal, pero con una metionina N-terminal añadida. En particular, una región codificadora de 550 pb que incluía en el extremo 3' el codón ATG para Met, así como sitios de restricción para Nde1 y BamH1 en los extremos 3' y 5', respectivamente, se insertó en el vector de expresión pET 11c (Novagen) en Nde1-BamH1 bajo el control del promotor del fago T7, y se transformó en *E. coli* B BL21 (DE3) y en *E. coli* B BL21 $\Delta(kpsM-kpsF)$. Las células se cultivaron en 100 ug/ml de LB amp hasta una DO_{450} de 0,5 y la expresión se indujo con IPTG 0,3 mM durante 4 horas a 37°C. Los extractos crudos de células se prepararon por ultrasonidos para el análisis de la expresión de FGF21.

15 El gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie en la Fig. 12 muestra una expresión igualmente exitosa de FGF21 en *E. coli* B BL21 DE3 y *E. coli* B BL21 $\Delta(kpsM-kpsF)$. Aunque el peso molecular calculado (PM) del FGF21 expresado de este modo (Met-FGF21) es de 19,5 kD, migraba en el gel como una proteína de 25 kD, lo que se debe probablemente al alto contenido en prolinas, que retrasa el movimiento de la proteína.

20 El ejemplo actual muestra que el rendimiento de FGF21 no se ve afectado por la manipulación genética de la cepa hospedadora.

Ejemplo 10: Expresión de la amilina humana en BL21 DE3 y BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$

La secuencia del péptido amiloide de 37 aminoácidos, amilina, fue publicada por Cooper et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. (84): 8628-8632, (1987). El gen se clonó y se fusionó N-terminalmente con una proteína ribosómica RL23 de *Thermotoga maritima*. La proteína de fusión de 146 aminoácidos tiene la secuencia siguiente (SEQ ID 14):

KQEKL^{SL}H^DVLIRPIITEKALILREQRKYVFEVNPLANKNLVKEAVEKLFNVKVEK^{VNI}
LNMKPKPKRRGIFEGKTRSWKKA^VTLKEGYTIKELEGEHSSSSDDDDK^KCNTAT-
CATQRLA-NFLVHSSN^NFGAILSSTNVGSNTY

25 El gen de fusión se clonó como se ha descrito en el Ejemplo 9 como un fragmento Nde1-BamH1 de 450 pb en pET 11c bajo el control del promotor T7, y el plásmido se transformó en BL21 DE3 y BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$.

30 La expresión se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 9, y el resultado se muestra en la Fig. 12, demostrando una vez más la expresión con alto rendimiento en los dos hospedadores de *E. coli* B, BL21 DE3 y BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$.

Ejemplo 11: Expresión de la leptina humana en BL21 DE3 y BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$

La secuencia de la leptina humana de 146 aminoácidos de longitud fue publicada por Masuzaki et al. en Diabetes (44): 855-858 (1995). La proteína es secretada en los seres humanos, con la adición de un péptido señal de 21 aminoácidos. La leptina madura que se expresaba intracelularmente en *E. coli* tiene la siguiente secuencia (SEQ ID 15):

MVPIQKVQDDTKLTIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILT^{LS}KMDQTL
AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD^{SL}GGVLEASGYST
EVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC

35 El gen de la leptina se clonó como se ha descrito en el Ejemplo 9, como un fragmento Nde1-BamH1 de 450 pb en pET11c bajo el control del promotor T7, y el plásmido se transformó en BL21 DE3 y en BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$.

40 La expresión se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 9, y el resultado se muestra en la Fig. 12, que ilustra una vez más la expresión con alto rendimiento en los dos hospedadores de *E. coli*, BL21 DE3 y BL21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$.

Se llega a la conclusión de que la eliminación del complejo de genes capsulares del grupo II no afecta al crecimiento

de las células en ninguna condición de crecimiento. También se puede concluir que la eliminación del complejo de genes capsulares del grupo II no afecta a la expresión de proteínas. Por lo tanto, con la eliminación completa del complejo de genes capsulares del grupo II se produce de este modo una cepa más segura para el uso de *E. coli* B BL21 (DE3) como una cepa hospedadora comercial para la producción de proteínas terapéuticas. La operación de delecionar los genes capsulares del grupo II en *E. coli* B BL21 (DE3) sitúa a esta cepa en la misma categoría de seguridad que *E. coli* K12, ya que el complejo de genes del grupo II es la única diferencia significativa entre las dos cepas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Novo Nordisk A/S
- 10 <120> Cepa de *E. coli*

<130> 7849

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótidos
- 20 <400> 1

tccttaccgc gggtaaacc cgcttaccgg gc 32
- 25 <210> 2

< 211> 34

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótidos
- 30 <400> 2

ctaccggaat tcttgatgat gtgatcctaa tctc 34
- 35 <210> 3

< 211> 29

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótidos
- 40 <400> 3

ttcggatcca tcagtcctt tgcacggaa 29
- 40 <210> 4

< 211> 30

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótidos

<400> 4
 gaacgagctc aactcccga atcatcaata 30

5
 <210> 5
 < 211> 32
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Oligonucleótidos

10
 <400> 5
 gcaccactaa ttcttaagaa cccgcccaca ag 32

<210> 6
 < 211> 30
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

15
 <220>
 < 223> Oligonucleótidos

<400> 6
 actggaattt ggacgggggt aggtattgcc 30

20
 <210> 7
 < 211> 28
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Oligonucleótidos

25
 <400> 7
 aattcttaag aacccgcccga caaggcgg 28

<210> 8
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

30
 <220>
 < 223> Oligonucleótidos

<400> 8
 cgacgatttc cggcagtttc tac 23

35
 <210> 9
 < 211> 24
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Oligonucleótidos

40
 <400> 9
 gccaggtttt caccgtaaca cgcc 24

<210> 10
 < 211> 23

ES 2 612 252 T3

< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Oligonucleótidos

5 <400> 10
cctgtggatc cagaacgttg ttg 23

10 <210> 11
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Oligonucleótidos

15 <400> 11
gaacgagctc atgttgataa aagtgaagtc 30

<210> 12
< 211> 508
< 212> PRT
< 213> *Arthrobacter ureafaciens*

ES 2 612 252 T3

<400> 12

Met Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ser Pro Thr Leu Pro Pro Gly Ser Phe
1 5 10 15

Ser Glu Thr Asn Leu Ala Ala Asp Arg Thr Ala Ala Asn Phe Phe Tyr
20 25 30

Arg Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Leu Gly Asn Asp Val Val Leu Ala Ala
35 40 45

Trp Asp Gly Arg Pro Gly Ser Ala Ala Asp Ala Pro Asn Pro Asn Ser
50 55 60

Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Gly Pro Val
65 70 75 80

Gln Val Ile Ala Ala Gly His Val Ala Asp Ala Ser Gly Pro Arg Tyr
85 90 95

Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Ile Tyr Asp Ala Glu Ala Asn Lys Val
100 105 110

Phe Ala Phe Phe Val Tyr Ser Lys Asp Gln Gly Phe Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Phe Gly Asn Asp Asp Ala Asp Arg Asn Val Ile Ser Ser Ala Val Ile
130 135 140

Glu Ser Ser Asp Ala Gly Val Thr Trp Ser Gln Pro Arg Leu Ile Thr
145 150 155 160

Ser Val Thr Lys Pro Gly Thr Ser Lys Thr Asn Pro Ala Ala Gly Asp
165 170 175

ES 2 612 252 T3

Val Arg Ser Asn Phe Ala Ser Ser Gly Glu Gly Ile Gln Leu Lys Tyr
 180 185 190

Gly Pro His Lys Gly Arg Leu Ile Gln Gln Tyr Ala Gly Asp Val Arg
 195 200 205

Gln Ala Asp Gly Ser Asn Lys Ile Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ser Asp
 210 215 220

Asp His Gly Val Thr Trp His Lys Gly Ala Asn Val Gly Asp Arg Met
 225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Thr Val Glu Leu Ser Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn
 245 250 255

Ser Arg Asp Asn Ala Asn Arg Gly Tyr Arg Lys Val Ala Val Ser Thr
 260 265 270

Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Gly Pro Val Ser Gln Asp Thr Glu Leu Pro
 275 280 285

Asp Pro Ala Asn Asn Gly Ala Ile Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Ala
 290 295 300

Gln Gly Ser Ala Asp Ala Lys Lys Leu Ile Phe Thr Asn Ala Asn Ser
 305 310 315 320

Lys Thr Gly Arg Glu Asn Val Ser Ala Arg Val Ser Cys Asp Asp Gly
 325 330 335

Glu Thr Trp Pro Gly Val Arg Thr Ile Arg Ser Gly Phe Ser Ala Tyr
 340 345 350

Ser Thr Val Thr Arg Leu Ala Asp Gly Lys Phe Gly Val Leu Tyr Glu
 355 360 365

Gly Asn Tyr Thr Asp Asn Met Pro Phe Ala Thr Phe Asp Asp Ala Trp
 370 375 380

Leu Asn Tyr Val Cys Ala Pro Leu Ala Val Pro Ala Val Asn Ile Ala
 385 390 395 400

Pro Ser Ala Thr Gln Glu Val Pro Val Thr Val Thr Asn Gln Glu Ala
 405 410 415

Thr Thr Leu Ser Gly Ala Thr Ala Thr Val Tyr Thr Pro Ser Gly Trp
 420 425 430

Ser Ala Thr Thr Val Pro Val Pro Asp Val Ala Pro Gly Ala Ser Val

ES 2 612 252 T3

435

440

445

Thr Val Thr Val Ala Leu Thr Ala Pro Ala Asp Ala Ser Gly Pro Arg
450 455 460

Ser Leu Asn Ala Ala Phe Thr Thr Ala Asp Gly Arg Val Ser Gln Phe
465 470 475 480

Thr Phe Thr Ala Thr Thr Pro Val Ala Pro Gln Val Gly Leu Thr Ile
485 490 495

Thr Gly Ser Ala Leu Glu His His His His His His
500 505

<210> 13

< 211> 209

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 13

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

ES 2 612 252 T3

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
 165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 195 200 205

Ser

<210> 14
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Thermotoga maritima y Homo sapiens

5

<400> 14
 Met Lys Gln Glu Lys Leu Ser Leu His Asp Val Leu Ile Arg Pro Ile
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Lys Ala Leu Ile Leu Arg Glu Gln Arg Lys Tyr Val Phe
 20 25 30

Glu Val Asn Pro Leu Ala Asn Lys Asn Leu Val Lys Glu Ala Val Glu
 35 40 45

Lys Leu Phe Asn Val Lys Val Glu Lys Val Asn Ile Leu Asn Met Lys
 50 55 60

Pro Lys Pro Lys Arg Arg Gly Ile Phe Glu Gly Lys Thr Arg Ser Trp
 65 70 75 80

Lys Lys Ala Val Val Thr Leu Lys Glu Gly Tyr Thr Ile Lys Glu Leu
 85 90 95

Glu Gly Glu His Ser Ser Ser Ser Asp Asp Asp Asp Lys Lys Cys Asn
 100 105 110

Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val His Ser
 115 120 125

Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly Ser Asn
 130 135 140

Thr Tyr
 145

<210> 15
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

ES 2 612 252 T3

<400> 15

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Extensión N-terminal

<400> 16

Met Glu Ala Glu

1

10

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *E. coli* B BL21 caracterizada porque tiene al menos un 25% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección, y que comprende un vector de expresión con una secuencia de ADN insertada que codifica un péptido.
- 5 2. Una cepa de *E. coli* B BL21 según la reivindicación 1, caracterizada porque tiene de un 75% a un 100% del complejo de genes capsulares del grupo II inactivado de forma permanente por delección.
3. Una cepa de *E. coli* B BL21 según la reivindicación 1, caracterizada porque tiene una delección total del complejo de genes capsulares del grupo II.
- 10 4. Una cepa de *E. coli* B BL21 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la *E. coli* es *E. coli* B BL21 (DE3).
5. Una cepa de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la *E. coli* es *E. coli* B BL21 (DE3) Δ dadX Δ alr.
- 15 6. Una cepa de *E. coli* B BL21 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en hGH, péptidos similares al glucagón, interleucinas, análogos de insulina, adiponectina de tipo silvestre, FGF-21, tripsina, aprotinina, amilina y leptina y análogos de los mismos y enzimas tales como sialidasa, transglutaminasa también conocida como tGasa, proteasa 3C de RVH también conocido como rinovirus humano, proteasa del virus del grabado del tabaco también conocido como VGT y sus variantes.
- 20 7. Un método para la producción de un péptido que comprende cultivar en un medio de cultivo adecuado, una cepa de *E. coli* B según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, seguido por aislamiento y purificación del péptido expresado mediante una técnica bien conocida.
8. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es hGH o un análogo de la misma.
9. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es FGF-21 o un análogo del mismo.
10. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es amilina o un análogo de la misma.
- 25 11. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es un péptido similar al glucagón o un análogo del mismo.
12. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es una interleucina o un análogo de la misma.
13. Un método según la reivindicación 7, en donde el péptido es un análogo de insulina.

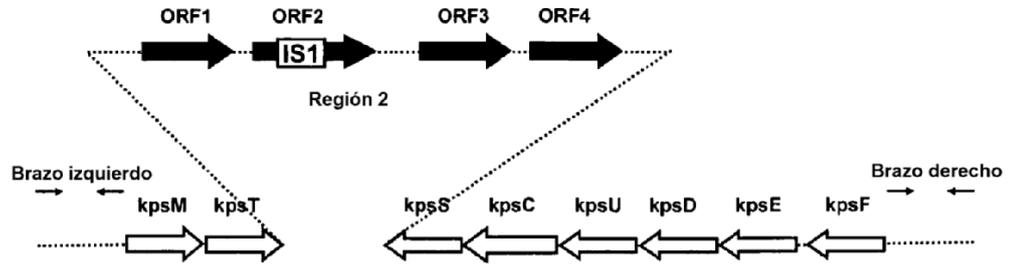


Fig. 1

Curva de crecimiento en fermentación

□, BL21(DE3) Δ dadX Δ alr Δ (kpsM-kpsF)/pNNC1a.23

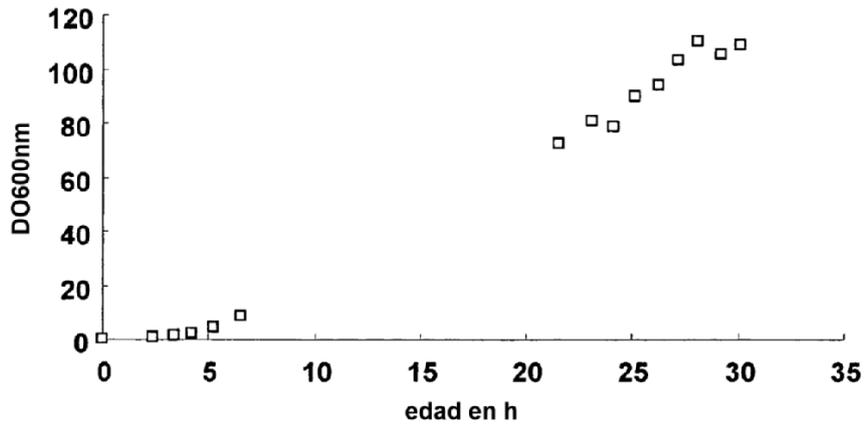


Fig. 9

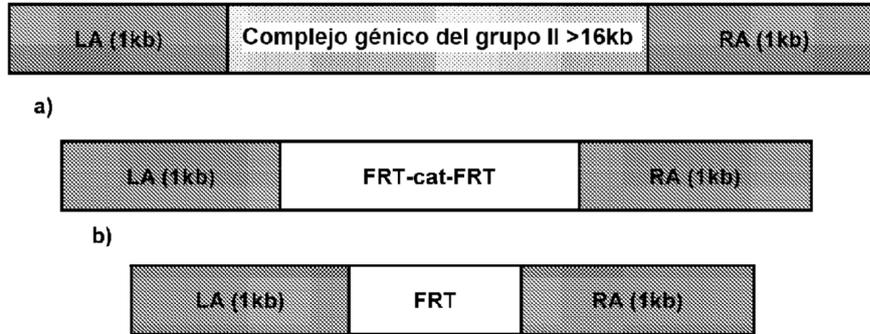


Fig. 2

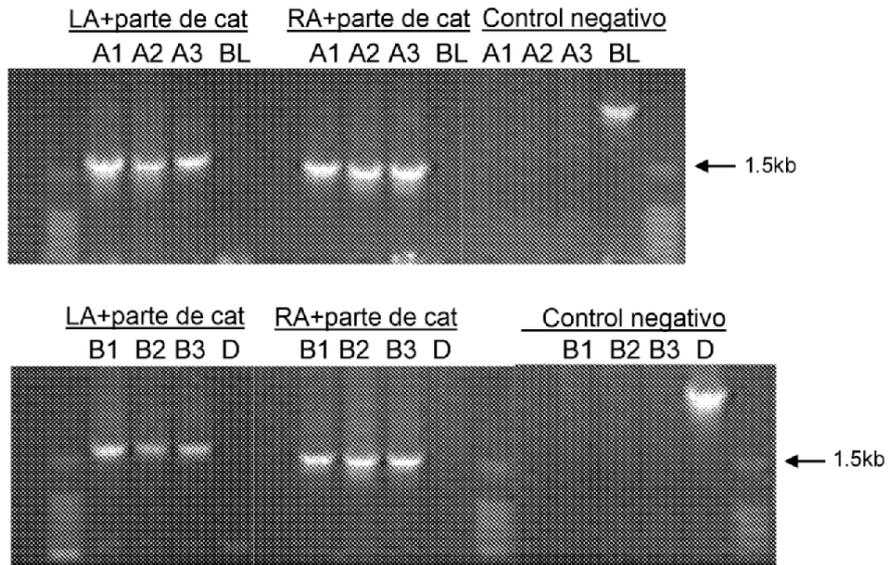


Fig. 3

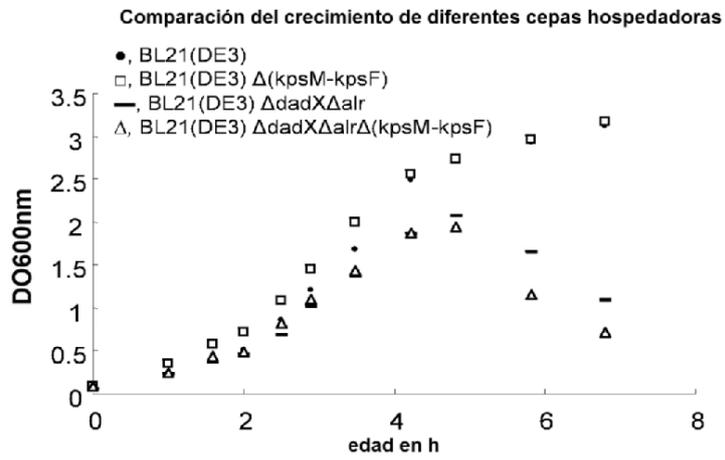


Fig. 4

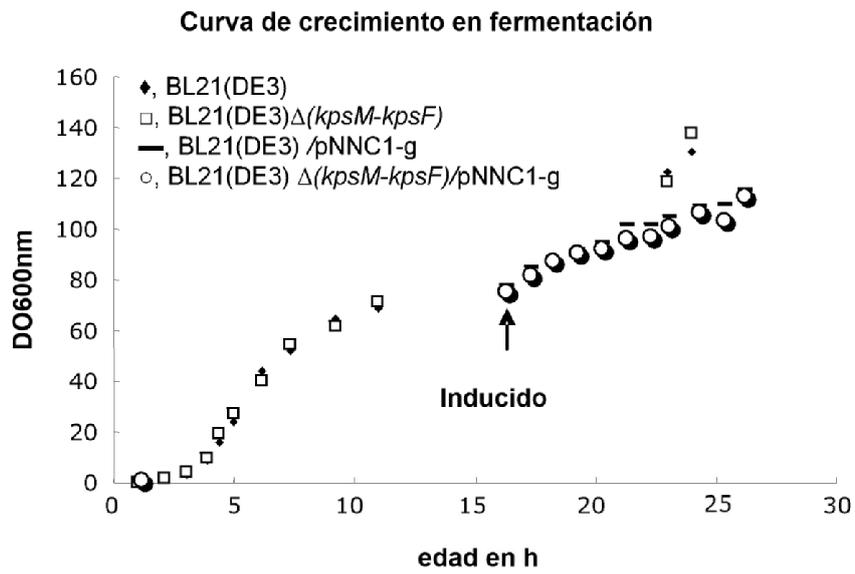


Fig.5

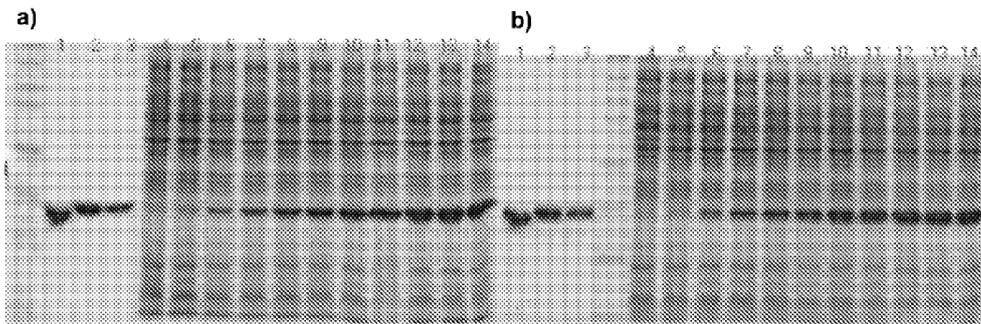


Fig. 6

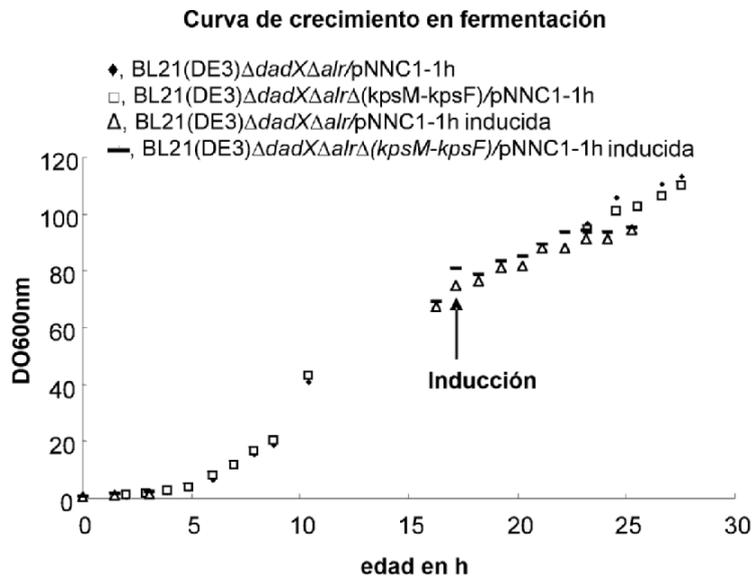


Fig.7

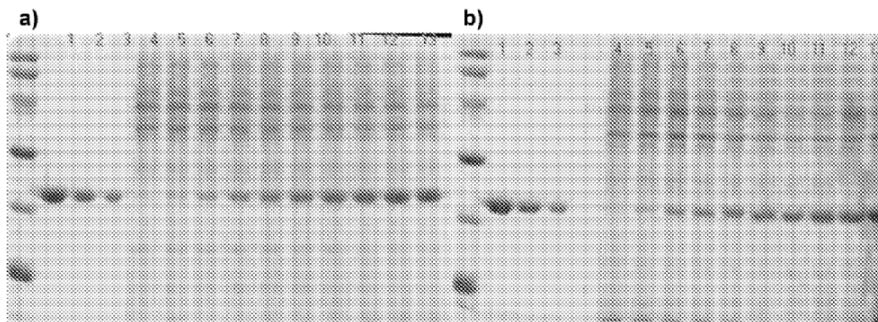


Fig. 8

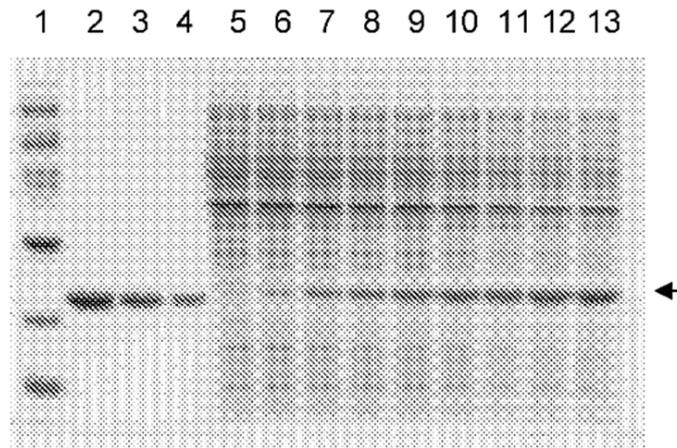


Fig. 10

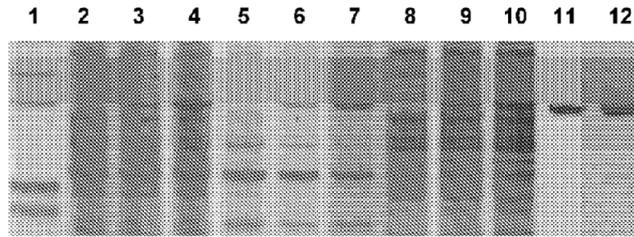


Fig. 11

BL21 DE3						B21 DE3 $\Delta(kpsM-kpsF)$							
FGF21		Amilina		Leptina		FGF21		Amilina		Leptina			
-	T	-	T	-	T	-	T	-	T	-	T		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

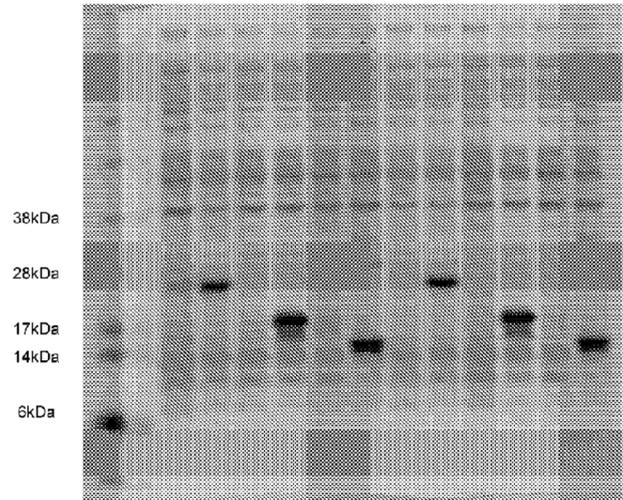


Fig. 12