

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 545**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2005 PCT/EP2005/013012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2006 WO06061173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2005 E 05817790 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 1824961**

54 Título: **Sistema de expresión del operón melibiosa**

30 Prioridad:

07.12.2004 EP 04028920

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

17.05.2017

73 Titular/es:

**LONZA LTD (50.0%)
Lonzastrasse
3930 Visp, CH y
MORPHOSYS AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BRASS, JOHANN;
KLEIN, JOACHIM;
OSTENDORP, RALF y
WEIDMANN, ARMIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 612 545 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 del operón melibiosa

La presente invención se refiere a vectores para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, polipéptidos tales como proteínas recombinantes en huéspedes procariotas. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevos vectores expresables en un huésped que comprende el promotor melAB del operón de melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped, y que codifica un péptido señal mientras que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se controla por dicho promotor melAB del operón melibiosa, y en el que el promotor melAB es deficiente en el sitio de unión de CRP1. La presente invención se refiere además al uso de estos vectores para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, polipéptidos.

Antecedentes de la invención

Muchos sistemas han sido descritos para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, polipéptidos tales como proteínas recombinantes en sistemas procariotas. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de expresión de genes heterólogos en sistemas huésped procariotas se han basado exclusivamente en un conjunto limitado de promotores bacterianos. Los promotores procariotas más ampliamente utilizados han incluido los promotores de la lactosa [lac] (Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33, 103-109), y el triptófano [trp] (Goeddel et al., 1980, Nature (Londres) 287, 411-416), y los promotores híbridos derivados de estos dos [tac y trc] (Brosius, 1984, Gene 27: 161-172; Amann y Brosius, 1985, Gene 40, 183-190). Otros sistemas de promotores inducibles tales como el promotor araB inducible por arabinosa (documento WO 86 04356), el promotor de ramnosa rhaSB inducible por L-ramnosa (documento WO 03068956) o el promotor de ramnosa rhaBAD inducible por la L-ramnosa (documento WO 2004/050877) han sido descritos así como para la expresión heteróloga de proteínas. Sin embargo, muchos de los promotores procariotas conocidos utilizados para la expresión de genes heterólogos tienen inconvenientes tales como la toxicidad del producto heterólogo a la célula huésped, bajas tasas de expresión del producto o la formación de agregados no funcionales (cuerpos de inclusión).

Hay otros sistemas de promotores inducibles que se han utilizado en la expresión homóloga de proteínas tales como el operón de melibiosa inducible por melibiosa como se describe por Belyaeva et al., 2000, Mol. Microbiol. 36(1), 211-222. Howard et al., Nucleic Acids Research, 2002, 30(12), 2692-2700 describe el mecanismo molecular de la unión de ADN de la proteína activadora de la transcripción MelR. La mayoría de estos sistemas de promotores inducibles utilizados para la expresión homóloga tienen el inconveniente de que sólo se han logrado tasas de inducción bajas y, por tanto, una baja expresión del producto homólogo deseado. Además, estos sistemas de promotores no están muy estrictamente regulados conduciendo, por lo tanto, a una actividad de fondo en un estado no inducido, lo que no permite un estricto control de la expresión. Por ejemplo Belyaeva et al. utilizó diferentes fragmentos del operón melibiosa fusionado a un gen lacZ de E. coli para la expresión de β -galactosidasa en E. coli. Sin embargo, los fragmentos (KK43, JK19) que produjeron la mayor actividad de β -galactosidasa produjeron también la más alta actividad de fondo.

Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar mejores sistemas de expresión procariotas para la expresión heteróloga de secuencias de ácidos nucleicos que no tienen las anteriormente mencionadas desventajas.

Sumario de la invención

Estos y otros objetos, como será evidente por la siguiente descripción, se han conseguido proporcionando nuevos vectores que comprenden una región promotora procariota que es útil para la expresión de alto nivel de un producto heterólogo deseado. Sorprendentemente, se ha encontrado que el promotor melAB del operón melibiosa permite una expresión estrechamente regulada de grandes cantidades de producto heterólogo. En un primer aspecto, el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo vector expresable en un huésped que comprende el promotor melAB del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico, que también codifica un péptido señal de E. coli melAB, se controla por dicha región promotora del operón melibiosa, y en el que el promotor melAB es deficiente en el sitio de unión de CRP1. También se proporcionan: el uso de dicho nuevo vector para la expresión heteróloga regulada de una secuencia de ácido nucleico en un huésped procariota; una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada expresable en un huésped que comprende la región promotora del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico es controlada por dicho promotor melAB del operón melibiosa; un huésped procariota transformado con dicho vector o dicha secuencia de ácido nucleico aislada y purificada; y un método para producir un polipéptido en un huésped mediante dicho vector.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones acompañantes.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el plásmido pBLL7 que contiene el promotor inducible de melibiosa melAB2 (PmelAB2) y una región de terminación de la transcripción (rrnB).

5 La Fig. 2 muestra el plásmido pBLL15 que contiene el promotor inducible de melibiosa (PmelAB2), secuencias que codifican para secuencias de señal enlazadas operativamente a la cadena ligera (ompA-VL3-CL) y la cadena pesada (phoA-VH-CH) de un fragmento Fab-H, y una región de terminación de la transcripción (rrnB).

La Fig. 3 muestra los resultados de una hibridación en mancha (con cadena ligera anti-humana para detectar Fab, peroxidasa alcalina conjugada) de extractos de lisozima de cepas W3110 no inducidas (-) e inducidas (+) con los diferentes plásmidos de expresión. Se indican los intervalos de tiempo.

10 La Fig. 4 muestra la transferencia Western de extractos de lisozima de las cepas W3110 (pBLL15) utilizando una cadena ligera anti-humana para detectar Fab, peroxidasa alcalina conjugada (carril 1: Referencia Fab-H (2 µg), carril 2: W3110 (pBLL15), inducida, 9 h, carril 3: W3110 (pBLL15), inducida, 12 h; carril 4: W3110 (pBLL15), inducida, 23 h).

15 La Fig. 5 muestra el plásmido pAKL15E que contiene el promotor inducible de melibiosa (PmelAB2) y los genes Fab-H con secuencias señal alteradas.

La Fig. 6 muestra el SDS-PAGE de extractos de lisozima de diferentes cepas de W3110 con concentraciones de anticuerpos altos de Fab-H. Las cepas que producen la cadena ligera y pesada sin secuencias señal se utilizan como una referencia negativa (carril 1: Marcador; carril 2: W3110 (pMx9-HuCAL-Fab-H); carril 3: W3110 (pBW22-Fab-H); carril 4: W3110 (pBLL15), carril 5: W3110 (pAKL14); carril 6: Estándar (2 µg)).

20 La Fig. 7 muestra el plásmido pJKL8 que contiene el promotor inducible de melibiosa (PmelAB2) y una secuencia que codifica una amidasa de la cepa KIE153 (*Burkholderia* sp. DSM9925), y una región de terminación de la transcripción (rrnB).

25 La Fig. 8 muestra el SDS-PAGE de extractos de lisozima de la cepa W3110 (pAKL15E) en presencia o ausencia del inductor melibiosa. La posición de la cadena ligera y pesada se indica (carril 1: Marcador; carril 2: W3110 (pAKL15E), no inducido; carril 3: W3110 (pAKL15E), inducido).

La Fig. 9 muestra el plásmido pBLL7-peIB-S1 que contiene el promotor melAB2 inducible de melibiosa y una secuencia que codifica para un anticuerpo de cadena sencilla (scFv, S1). La codificación de secuencia para S1 está precedida por una secuencia que codifica para un péptido señal PeIB.

30 La Fig. 10 muestra el SDS-PAGE de extractos crudos de la cepa W3110 no inducida (-) y (+) (pBLL7-peIB-S1). Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo como se indica. Se analizaron las fracciones de proteínas solubles e insolubles después del tratamiento de lisozima. Una flecha indica la proteína scFv. M = Mark12, estándar de peso molecular de Invitrogen.

Descripción detallada de la invención

35 Como se usa en este documento, las siguientes definiciones se suministran con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención.

40 Un "vector expresable en un huésped" o "vector de expresión" es una construcción de ácido polinucleico, generada recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos especificados de ácido polinucleico que permiten la transcripción de una secuencia de ácido nucleico particular en una célula huésped. Normalmente, este vector incluye una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico particular que se transcribe unida operativamente a un promotor. Un vector expresable en un huésped puede ser, por ejemplo, un plásmido autónomo o auto-replicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus.

45 El término o expresiones "huésped", "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en este documento para indicar una célula procarionta en la que se han introducido uno o más vectores o secuencias de ácido nucleico aisladas y purificadas de la invención. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía estar incluida dentro del alcance del término o de las expresiones tal como se usan en el presente documento.

50 El término "comprende" se utiliza generalmente en el sentido de incluir, es decir, que permita la presencia de una o más características o componentes.

"Promotor" tal como se utiliza en este documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una unidad transcripcional. Una "región promotora" es una región reguladora capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación aguas abajo (dirección 3').

Dentro de la región promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión de la proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa tal como la región -35 putativa y la caja Pribnow.

5 "Operón Melibiosa" se refiere al operón melibiosa de *E. coli* como se describe en Hanatani et al., 1984, *J Biol. Chem.*, 259 (3), 1807-1812. El operón melibiosa es un operón catabólico regulado positivamente que contiene dos promotores divergentes. Un promotor (promotor MelR) es responsable de la expresión del gen MelR, que es esencial para la estimulación dependiente de melibiosa del segundo promotor (promotor melAB). La transcripción inducida por melibiosa a partir de este segundo promotor inicia la co-transcripción del gen melA que codifica una alfa-galactosidasa y el gen melB que codifica una melibiosa permeasa. El operón melibiosa contiene dos sitios de
10 unión de proteína regulador de catabolito, CRP2 en la posición -81,5 y CRP1 en la posición -195,5 cadena arriba del sitio de iniciación de la transcripción del promotor melAB y cinco sitios de unión MelR en las posiciones -42,5 (Sitio 2'), -62,5 (sitio 2), -100,5 (Sitio1), -120,5 (sitio 1') y -238,5 (sitio R) aguas arriba del sitio de iniciación de la transcripción del promotor melAB. Con "región promotora del operón melibiosa" se entiende la región del promotor que regula la expresión del gen de melA y el gen de melB, incluyendo el promotor melAB, el promotor melR, el gen
15 melR y los sitios de unión CRP y los sitios de unión MelR. El "promotor melAB" que se hace referencia en el presente documento consiste esencialmente en el sitio de la transcripción de iniciación, la región -35 putativa, la caja Pribnow, los sitios de unión CRP y los sitios de unión MelR. El "promotor melAB deficiente en el sitio de unión CRP1" que se hace referencia en el presente documento consiste esencialmente del sitio de iniciación de la transcripción, la
20 región putativa -35, la caja Pribnow, el sitio de unión CRP2 y los sitios de unión MelR excepto el Sitio R. El "promotor melAB deficiente en el sitio de unión CRP1" también podría contener un sitio de unión CRP1 que se suprime o se bloquea. Esto se puede hacer mediante técnicas conocidas tales como mutagénesis de transposón o mutación knock-out. Preferentemente, el "promotor melAB deficiente en el sitio de unión CRP1" no contiene ningún sitio de unión CRP1.

25 La melibiosa (6-O-[alfa]-D-galactopiranosil-D-glucosa) es un disacárido que puede ser obtenido a partir de rafinosa por fermentación con levadura.

"CRP" significa "Proteína Reguladora de Catabolitos". "CRP" a menudo se conoce en la técnica como "proteína receptora de AMP cíclico", que tienen significados sinónimos. CRP es una proteína reguladora controlada por AMP cíclico (cAMP) que media la activación de operones catabólicos tales como el operón melibiosa.

30 Un "potenciador" es una secuencia de ácido nucleico que actúa para potenciar la transcripción de una unidad transcripcional independiente de la identidad de la unidad transcripcional, la posición de la secuencia en relación con la unidad transcripcional, o la orientación de la secuencia. Los vectores de la presente invención incluyen opcionalmente potenciadores.

35 "Unidad de transcripción", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que normalmente se transcribe en una sola molécula de ARN. La unidad transcripcional puede contener un gen (monocistrónico) o dos (dicistrónico) o más genes (policistrónico) que codifican para moléculas de polipéptido funcionalmente relacionadas.

40 Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando está colocada en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está operativamente unido al ADN para una proteína si se expresa como una preproteína que participa en la secreción de la proteína; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o una región de iniciación de traducción tal como un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un polipéptido si se coloca de modo que facilite la traducción del polipéptido. La vinculación se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o engarces se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

45 "Ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" o "ácido nucleico aislado y purificado o secuencia de ácido nucleico", como se refieren en la presente invención, pueden ser ADN, ARN, o híbrido de ADN/ARN. En caso de que el ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico se encuentre en un vector, es usualmente ADN. El ADN que se denomina en este documento puede ser cualquier secuencia de polidesoxinucleótido, incluyendo, por ejemplo, ADN de doble cadena, ADN de cadena simple, ADN de doble cadena en el que una o ambas hebras se componen de dos
50 o más fragmentos, ADN bicatenario en donde una o ambas hebras tienen un esqueleto de fosfodiéster ininterrumpido, ADN que contiene una o más parte(s) monocatenarias y una o más parte(s) de doble cadena, ADN de doble cadena en el que las hebras de ADN son totalmente complementario, ADN de doble cadena en el que las hebras de ADN solamente son parcialmente complementarias, ADN circular, ADN covalentemente cerrado, ADN lineal, ADN covalentemente reticulado, ADNc, ADN sintetizado químicamente, ADN semisintético, ADN biosintético,
55 ADN aislado de forma natural, ADN digerido por enzima, ADN cizallado, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromo, ADN que contiene una o más especies de origen no natural de ácido nucleico. Las secuencias de ADN pueden ser sintetizadas por técnicas químicas estándar, por ejemplo, el método fosfotriéster o vía métodos de síntesis automatizados y métodos de PCR. La secuencia de ADN purificada y aislada también se puede producir por técnicas enzimáticas.

El RNA al que se hace referencia en el presente documento puede ser, por ejemplo, ARN monocatenario, ARNc, ARN bicatenario, ARN bicatenario en donde una o ambas hebras se componen de dos o más fragmentos, ARN bicatenario en donde una o ambas hebras tienen un esqueleto de fosfodiéster ininterrumpido, ARN que contiene una o más parte(s) monocatenarias y una o más parte(s) de doble cadena, ARN de doble cadena en el que las hebras de ARN son totalmente complementarias, ARN de doble cadena en el que las hebras de ARN solamente son parcialmente complementarias, ARN covalentemente reticulado, ARN digerido por enzima, ARN cortado, ARNm, ARN sintetizado químicamente, ARN semisintético, ARN biosintético, ARN aislado naturalmente, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y ARN marcado con fluorocromo, ARN que contiene una o más especies de ácido nucleico de origen no natural.

Con "variantes" o "variantes de una secuencia" se entiende una secuencia de ácido nucleico que varía de la secuencia de referencia por sustituciones conservadoras de ácido nucleico, mediante el cual uno o más ácidos nucleicos se sustituyen por otros con las mismas características. Las variantes abarcan también las secuencias degeneradas, secuencias con deleciones e inserciones, siempre y cuando tales secuencias modificadas exhiban la misma función (funcionalmente equivalente) que la secuencia de referencia.

Tal como se utiliza en este documento, los términos "polipéptido", "péptido", "proteína", "polipeptídico" y "peptídico" se usan indistintamente para designar una serie de residuos de aminoácidos conectados a otros por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de los residuos adyacentes.

La expresión "secuencia de ácido nucleico aislada y purificada" se refiere al estado en el que la secuencia de ácido nucleico estará de acuerdo con la presente invención. La secuencia de ácido nucleico estará libre o sustancialmente libre de material con el que está naturalmente asociada, tales como otros ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, un cultivo celular) cuando tal preparación es practicada por tecnología recombinante in vitro o in vivo.

Los términos "transformación", "transformado" o la expresión "introducción de un ácido nucleico en una célula huésped" denotan cualquier proceso en donde un ácido nucleico extracelular, como un vector, con o sin material de acompañamiento, entra en una célula huésped. La expresión "célula transformada" o "transformada célula" significa la célula o su progenie en la que se ha introducido el ácido nucleico extracelular y que, por lo tanto, alberga el ácido nucleico extracelular. El ácido nucleico puede ser introducido en la célula de modo que el ácido nucleico sea replicable, ya sea como un integrante cromosómico o como un elemento cromosómico extra. La transformación de las células huésped apropiadas con, por ejemplo, un vector de expresión se puede lograr por métodos bien conocidos tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas o por métodos químicos tales como transformación mediada por fosfato de calcio, por ejemplo, se describe en Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory o en Ausubel et al. 1994, Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons.

"Secuencia heteróloga de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico heteróloga a un huésped" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un producto de expresión tal como un polipéptido que es extraño al huésped ("expresión heteróloga" o "producto heterólogo"), es decir, una secuencia de ácido nucleico procedente de un donante diferente del huésped o una secuencia de ácido nucleico sintetizada químicamente que codifica, por ejemplo, un producto de expresión tal como un polipéptido que es extraño al huésped. En caso de que el huésped sea de una especie procarionta particular, la secuencia heteróloga de ácido nucleico se origina preferentemente a partir de un género o familia diferente, más preferido de un orden o clase diferente, en particular de un filo diferente (división) y más en particular de un dominio diferente (imperio) de organismos.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga procedente de un donante diferente del huésped se puede modificar, antes de que se introduzca en una célula huésped, mediante mutaciones, inserciones, deleciones o sustituciones de ácidos nucleicos individuales o una parte de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, siempre y cuando tales secuencias modificadas muestren la misma función (funcionalmente equivalente) que la secuencia de referencia. Una secuencia de ácido nucleico heteróloga que se hace referencia en el presente documento abarca también secuencias de ácidos nucleicos procedentes de un dominio diferente (imperio) de organismos tales como a partir de eucariotas (de origen eucariota) tales como, por ejemplo, anticuerpos humanos que se han utilizado en las bibliotecas de presentación en fagos y de las cuales los ácidos nucleicos individuales o una parte de las secuencias de ácido nucleico se han modificado de acuerdo con el "uso de codones" de un huésped procarionta.

"Secuencia de señal" o "secuencia del péptido señal" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia corta de aminoácido (es decir, del péptido señal) presente en el extremo NH₂-terminal de ciertas proteínas que normalmente se exportan por las células a ubicaciones no citoplásmicas (por ejemplo, por secreción) o que son componentes de la membrana. Los péptidos señal dirigen el transporte de proteínas desde el citoplasma a ubicaciones no citoplásmicas.

"Región de iniciación de la traducción" es una región señal que promueve el inicio de la traducción y que funciona como el sitio de unión a ribosomas tal como la secuencia Shine Dalgarno.

"Región de terminación de la transcripción" se refiere a una secuencia que causa que la ARN polimerasa termine la transcripción. La región de terminación de transcripción es generalmente parte de una unidad transcripcional y aumenta la estabilidad del ARNm.

"Anticuerpo" se refiere a una clase de proteínas plasmáticas producidas por las células B del sistema inmune después de la estimulación por un antígeno. Los anticuerpos de mamífero (mejor dicho, humanos) son inmunoglobulinas Ig de la clase G, M, A, E o D. El término "anticuerpo" tal como se utiliza para los propósitos de esta invención incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos anti-idiotípicos y auto-anticuerpos presentes en enfermedades autoinmunes, tales como la diabetes, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, así como anticuerpos quiméricos. La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más.

El término anticuerpo se utiliza en el sentido de anticuerpos completos y fragmentos de unión de los mismos. Los fragmentos de unión incluyen fragmentos de cadena sencilla, fragmentos Fv y fragmentos Fab. La expresión fragmento Fab se utiliza a veces en la técnica para referirse al fragmento de unión que resulta de la escisión con papaína de un anticuerpo intacto. Los términos Fab' y F(ab')₂ se utilizan a veces en la técnica para referirse a fragmentos de unión de anticuerpos intactos generados por la escisión con pepsina. En el contexto de la presente invención, Fab se utiliza para referirse genéricamente a fragmentos de unión de doble cadena de anticuerpos intactos que tienen al menos sustancialmente completos los dominios variables de la cadena ligera y pesada suficientes para los enlaces específicos de antígeno, y partes de las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada suficientes para mantener la asociación de las cadenas ligeras y pesadas. Un ejemplo de tal Fab se describe en Skerra et al., 1988, Science 240 (4855), 1038 a 1041, por ejemplo. Un fragmento Fab, por ejemplo, del idiotipo IgG puede o no contener al menos uno de los dos residuos de cisteína que forman los dos enlaces disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas en la inmunoglobulina intacta. Por lo general, los fragmentos Fab se forman por complejación de una cadena ligera de longitud completa o sustancialmente de longitud completa con una cadena pesada que comprende el dominio variable y al menos el dominio CH1 de la región constante.

Además, la cisteína C-terminal en la cadena ligera puede ser reemplazada con serina u otro aminoácido para eliminar el enlace intercadena disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras de acuerdo con la presente invención. Además están abarcados anticuerpos quiméricos que son anticuerpos cuyos genes de cadena pesada y ligera se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, segmentos que codifican la región variable y segmentos que codifican la región constante), por ejemplo, pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos (C), tales como IgG1 una IgG4. Un anticuerpo quimérico típico es, por lo tanto, una proteína híbrida que consiste en el V o el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y un C o el dominio efector de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad como un anticuerpo de ratón u otro no humano que proporciona las regiones variables del anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, incluyendo, maduración de la afinidad por ingeniería ya sea natural o artificial. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" sí incluye anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en las secuencias marco humanas (es decir, anticuerpos humanizados). Las variantes funcionales de tales "anticuerpos humanos", por ejemplo, versiones truncadas de los mismos o muteínas modificadas por ingeniería donde, por ejemplo, residuos de prolina individuales o de cisteína han sido diseñados por medio de ingeniería genética bien conocidos en la técnica están abarcadas por la expresión, en contraste. Los ejemplos de tales pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 98/02462. Sin embargo, la expresión solo se relaciona con la secuencia de aminoácidos de dicho anticuerpo, con independencia de cualquier glicosilación u otra modificación química del esqueleto peptídico.

En un aspecto, la presente invención proporciona un vector expresable en un huésped que comprende el promotor melAB del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped y una secuencia señal operativamente unida a dicha secuencia

de ácido nucleico y que codifica un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en los péptidos señal de E. LamB, MalE, OmpA and PhoA, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se controla por dicho promotor melAB del operón melibiosa y en el que el promotor melAB es deficiente en el sitio de unión de CRP1.

5 El vector de acuerdo con la invención es preferiblemente un plásmido autónomo o auto-replicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus. Una amplia variedad de combinaciones huésped/vector se puede emplear en la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómico y/o sintéticos. Los vectores adecuados incluyen vectores con rango de huésped específico, tales como, por ejemplo, vectores
10 específicos para E. coli, así como vectores con amplio espectro de huésped, tales como vectores útiles para las bacterias Gram-negativas. Plásmidos de "baja-copia", "media-copia", así como de "alta copia" se pueden utilizar.

Los vectores útiles para, por ejemplo, la expresión en E. coli son: pQE70, pQE60 y pQE-9 (Qiagen, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Bio-Tech, Inc.); pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pACYC177, pACYC184, pRSF1010 y pBW22 [Wilms et al., 2001, Biotecnología y Bioingeniería, 73
15 (2) 95-103] o derivados de los mismos tales como el plásmido pBLL15 o el plásmido pAKL15E. Además los plásmidos útiles son bien conocidos por las personas expertas en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Cloning Vectors" (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985).

Los vectores preferidos de la presente invención son plásmidos autónomos o autorreplicantes, más preferidos son los vectores con rango de huésped específico tales como los vectores específicos para, por ejemplo, E. coli. Los
20 más preferidos son pBR322, pUC18, pACYC177, pACYC184, pRSF1010 y pBW22 o derivados de los mismos, tales como el plásmido pBLL15 o el plásmido pAKL15E, particularmente preferido es el pBW22 o derivados de los mismos, tales como el plásmido pBLL15 o el plásmido pAKL15E, más particularmente preferidos son pBLL15 o pAKL15E, muy especialmente preferido es el pAKL15E.

La región promotora del operón melibiosa utilizado en la presente invención es el promotor melAB, que es deficiente en el sitio de unión CRP1. En una realización preferida particular, el promotor melAB, deficiente en el sitio de unión
25 CRP1, consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia complementaria de la misma. Por lo general, los sitios de unión MelR de la región promotora no se han modificado. El promotor melAB, deficiente en el sitio de unión CRP1, consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia complementaria de la misma usada en la presente invención, son, por lo general, del operón melibiosa de E. coli o de una región promotora equivalente funcional de
30 otros organismos procariontes, en particular, de organismos de la familia de Enterobacteriaceae. Preferiblemente, el promotor melAB, deficiente en el sitio de unión CRP1, que consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia complementaria de la misma, son del operón melibiosa de E. coli. Una región promotora funcional equivalente de otros organismos procariontes abarca una región promotora que es inducible por melibiosa, es decir, una región promotora que tiene una actividad de expresión mayor en presencia que en ausencia de melibiosa.

La unidad transcripcional de acuerdo con la presente invención generalmente comprende además una región de
35 iniciación de la traducción aguas arriba del punto de iniciación de la traducción de dicha unidad transcripcional, consistiendo dicha región de iniciación de la traducción en la secuencia AGGAGATATACAT (SEQ ID NO. 2), mientras que la región de iniciación de la traducción está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico. La secuencia AGGAGATATACAT (SEQ ID NO. 2) está situada generalmente aguas arriba directamente adyacente al
40 punto de iniciación de la traducción de la unidad transcripcional que puede ser ATG, GTG o TTG.

De acuerdo con la invención, dicha unidad transcripcional comprende adicionalmente una secuencia señal unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico heteróloga de la invención y que codifica un péptido señal
45 seleccionado del grupo que consiste en los péptidos señal de E. coli LamB, MalE, OmpA y PhoA. En caso de que se utilice una unidad transcripcional dicistrónica o policistrónica, se pueden aplicar diferentes o idénticas secuencias de señal unidas operativamente a cada uno de los cistrones. Preferiblemente se utilizan en tal caso diferentes secuencias señal.

Las secuencias señal que se emplean en los vectores de expresión de la presente invención se pueden obtener comercialmente o sintetizarse químicamente. Por ejemplo, las secuencias señal se pueden sintetizar de acuerdo con el método de la fosforamidita triéster en fase sólida descrito, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetrahedron
50 Letts. 22: 1859-1862 (1981), utilizando un sintetizador automatizado, como se describe en Van Devanter et. al., Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168 (1984). La purificación de los oligonucleótidos puede ser realizada por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Render, J. Chrom. 255: 137-149 (1983).

Por lo general, dicha unidad transcripcional comprende además una región de terminación de la transcripción
55 seleccionada de rrnB, ARN 1, T7Te, rrnB T1, trp a L126, trp a, TR2, T3Te, P14, tonB t, y trp a L153. Preferiblemente, se utiliza la secuencia terminadora transcripcional rrnB.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga de acuerdo con la presente invención codifica un producto de expresión que es extraño al huésped. En caso de que el huésped sea de una especie procarionte, tal como E. coli, la secuencia

de ácido nucleico de interés es más preferiblemente de otra clase, como la gammaproteobacteria tal como, por ejemplo, Burkholderia sp., en particular de un filo diferente, tal como bacterias archae, y más en particular de un organismo eucariota, tal como mamíferos, en particular, seres humanos. Sin embargo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga podría modificarse de acuerdo con el "uso de codones" del huésped. La secuencia heteróloga de acuerdo con la presente invención es por lo general un gen de interés. El gen de interés codifica preferiblemente un polipéptido heterólogo tal como una proteína estructural, reguladora o terapéutica, o fusiones N- o C-terminales de la proteína estructural, reguladora o terapéutica con otras proteínas ("Marcadoras") tales como la proteína verde fluorescente u otras proteínas de fusión. La secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar también una transcripción que puede ser utilizada en forma de ARN, tal como, por ejemplo, ARN antisentido.

La proteína puede ser producida como un agregado insoluble o como una proteína soluble que está presente en el citoplasma o en el espacio periplásmico de la célula huésped, y/o en el medio extracelular. Preferiblemente, la proteína se produce como una proteína soluble que está presente en el espacio periplásmico de la célula huésped y/o en el medio extracelular. Ejemplos de proteínas incluyen hormonas tales como la hormona del crecimiento, factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico, sustancias analgésicas como la encefalina, enzimas como la quimotripsina, anticuerpos, receptores a hormonas e incluye además las proteínas por lo general usadas como marcadores de visualización, por ejemplo, la proteína fluorescente verde.

Otras proteínas de interés son los receptores del factor de crecimiento (por ejemplo, FGFR, PDGFR, EFG, NGFR, y VEGF) y sus ligandos. Otras proteínas son los receptores de la proteína G e incluyen el receptor de la sustancia K, el receptor de la angiotensina, receptores [alfa] - y [beta]-adrenérgicos, los receptores de serotonina, y el receptor de PAF (véase, por ejemplo, Gilman, Ann. Rev. Biochem. 56, 625-649 (1987)). Otras proteínas incluyen los canales de iones (por ejemplo, los canales de calcio, sodio, potasio), los receptores muscarínicos, los receptores de acetilcolina, los receptores de GABA, receptores de glutamato, y los receptores de dopamina (véase Harpold, patentes de EE.UU. Nos. 5.401.629 y 5.436.128). Otras proteínas de interés son las proteínas de adhesión, tales como las integrinas, selección y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (véase Springer, Nature 346, 425-433 (1990). Osborn, Cell 62, 3 (1990); Hynes, Cell 69, 11 (1992)). Otras proteínas son las citocinas, tales como las interleucinas IL-1 a IL-13, factores de necrosis tumoral [alfa] y [beta], interferones [alfa], [beta] y [gamma], factor de crecimiento tumoral beta (TGF [beta]), factor estimulante de colonias (CSF) y factor estimulante de colonias de monocitos granulocitos (GM-CSF) (véase citoquinas humanas: Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research. Agrawal et al. eds., Blackwell Scientific, Boston, Mass. 1991). Otras proteínas de interés son los mensajeros intracelulares e intercelulares, tales como, la adenil ciclasa, guanil ciclasa, y fosfolipasa C. Los fármacos son también proteínas de interés. La proteína heteróloga de interés puede ser de origen humano, de mamífero o procariontario. Otras proteínas son antígenos, tales como las glicoproteínas y los carbohidratos de patógenos microbianos, tanto virales como bacterianos, y de tumores. Otras proteínas son enzimas como la quimosina, proteasas, las polimerasas, deshidrogenasas, nucleasas, glucanasas, oxidasas, α -amilasa, oxidorreductasas, lipasas, amidasas, nitrilo hidratasas, esterases o nitrilasas.

Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga, según la presente invención, codifica un polipéptido, más preferiblemente un anticuerpo y más preferiblemente un fragmento Fab. En particular, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, más particularmente un fragmento Fab humano se codifica por la secuencia de ácido nucleico. El fragmento Fab humano codificado por la secuencia de ácido nucleico es preferiblemente o bien un fragmento de anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo humano que fue injertado con al menos una CDR de otra especie de mamífero. En una realización más preferida, el fragmento Fab humano es un HuCAL-Fab completamente humano obtenible a partir de una biblioteca artificial, basado en el consenso-marco de anticuerpo humano de fago que se asignó al azar artificialmente en el CDR como se describe por Knappik et al., 2000, J. Mol. Biol. 296 (1), 57-86. En otra realización opcional más preferida, el fragmento Fab humano opcionalmente quimérico, CDR injertado, es un no-HuCAL-Fab en contraposición a la definición de HuCAL-Fab en lo anterior, que en el caso de un fragmento Fab completamente humano preferiblemente significa que no comparte el marco secuencia de consenso HuCAL pero sus porciones de secuencia no CDR son al menos 70%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 95% idénticas en secuencia de aminoácidos a las secuencias codificadas de la línea germinal de las cadenas ligeras y pesadas constantes y variables respectivas, además, y más preferiblemente que sus CDRs se obtienen directamente de secuencias genómicas de origen natural de células linfoides que incluyen eventos de maduración de afinidad genómica.

El fragmento Fab se deriva preferiblemente de un anticuerpo IgG y no contiene residuos de cisteína que formen los dos enlaces disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas en la inmunoglobulina intacta. En particular, la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo o preferiblemente del fragmento Fab se codifican por una unidad transcripcional dicistrónica, mientras que cada cadena está unida operativamente a una secuencia señal y una región de iniciación de la traducción idéntica aguas arriba del punto de iniciación de la traducción de la unidad transcripcional. En una realización preferida, la región de iniciación de traducción consiste en la secuencia AGGAGATATACAT (SEQ ID. NO 2).

En la presente invención, el orden y la distancia en la que la secuencia señal y la secuencia de ácido nucleico heteróloga están dispuestas dentro de los vectores de expresión se puede variar. En realizaciones preferidas, la secuencia señal está 5' (aguas arriba) respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, el polipéptido de interés. La secuencia del péptido señal y la secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, el

polipéptido de interés se puede separar de cero a aproximadamente 1000 aminoácidos. En realizaciones preferidas, la secuencia del péptido señal y la secuencia del ácido nucleico que codifica, por ejemplo, el polipéptido de interés están directamente adyacentes entre sí, es decir, separados por cero ácidos nucleicos.

5 Preferiblemente, la región promotora y la unidad transcripcional unida operativamente del vector de la presente invención consisten en la secuencia de SEQ ID NO. 3, o una secuencia complementaria de la misma.

Más preferiblemente, la región promotora y la unidad transcripcional unida operativamente del vector de la presente invención consisten en la secuencia SEQ ID NO. 4 o una secuencia complementaria de la misma.

10 También abarcado por la presente invención está el uso de un vector de acuerdo con la invención para la expresión heteróloga regulada de una secuencia de ácido nucleico en un huésped procariota. La expresión puede ser regulada por la cantidad de melibiosa disponible para el huésped procariota. Por lo general, la cantidad de melibiosa en el medio del huésped procariota cultivado está entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 10 g/l, más preferiblemente entre 1 y 5 g/l.

15 Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica para un polipéptido, más preferiblemente para un anticuerpo y más preferiblemente para un fragmento Fab, mientras que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o el fragmento Fab se expresan en cantidades iguales, lo que conduce a altas concentraciones de anticuerpo funcional o fragmento Fab. En particular, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, más particularmente un fragmento Fab humano, más particularmente un fragmento Fab humano como se describe anteriormente se codifica por la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

20 Con el fin de obtener altas concentraciones de anticuerpo funcional o fragmento Fab, es esencial tener una cantidad igual de las cadenas pesadas y ligeras que se expresan. En el caso de que una de ambas cadenas se produzca en exceso en comparación con la otra cadena, se pueden construir agregados inmunoreactivos no reducibles de alto peso molecular, lo cual es indeseable. Sorprendentemente, se ha encontrado que con los vectores de la presente invención se pueden obtener altos títulos de anticuerpos funcionales, mientras que sólo se construyen cantidades muy bajas de la cadena pesada o ligera que se producen en exceso o de agregados inmunoreactivos de alto peso molecular. Por lo general, menos del 20%, preferiblemente menos del 10% de la cantidad expresada del anticuerpo o fragmento Fab se expresan como cadena pesada o ligera que se produce en exceso o agregados inmunoreactivos de alto peso molecular. La cantidad de las cadenas pesada y ligera en sobreproducción y de agregados inmunoreactivos de alto peso molecular se puede medir mediante el análisis de extractos del huésped que expresan el anticuerpo o el fragmento Fab tal como extractos de lisozima de la célula huésped cultivada utilizando SDS-PAGE o transferencia Western.

35 En todavía otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada expresable en un huésped que comprende el promotor melAB del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped, y una secuencia señal operativamente unida a dicha secuencia de ácido nucleico y que codifica un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en los péptidos señal de E. coli LamB, MalE, OmpA y PhoA, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se controla por dicho promotor melAB del operón melibiosa y en el que el promotor melAB es deficiente en el sitio de unión CRP1. La secuencia de ácido nucleico aislada y purificada más preferida consiste en SEQ ID NO. 1, una secuencia complementaria de la misma. En particular, la secuencia de ácido nucleico aislada y purificada consiste en SEQ ID NO. 3, una secuencia complementaria de la misma. Más particularmente, la secuencia de ácido nucleico aislada y purificada consiste en SEQ ID NO. 4 o una secuencia complementaria de la misma. La secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de esta invención se puede aislar de acuerdo con protocolos de PCR estándar y métodos bien conocidos en la técnica. Dicha secuencia de ADN purificada y aislada puede comprender además una o más secuencias reguladoras, como se conoce en la técnica, por ejemplo, un potenciador, usualmente empleado para la expresión del producto codificado por la secuencia de ácido nucleico.

45 Con el fin de seleccionar las células huésped con éxito y transformadas de manera estable con el vector o la secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de la presente invención, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, con resistencia a antibióticos) se puede introducir en las células huésped junto con la secuencia de ácido nucleico de interés. El gen que codifica un marcador seleccionable puede estar ubicado en el vector o en la secuencia de ácido nucleico aislada y purificada o puede opcionalmente ser co-introducido en forma separada, por ejemplo, en un vector separado. Varios marcadores de selección se pueden utilizar incluyendo aquellos que confieren resistencia a los antibióticos, tales como higromicina, ampicilina y tetraciclina. La cantidad del antibiótico se puede adaptar como se desee con el fin de crear condiciones selectivas. Por lo general, se utiliza un marcador seleccionable. También se pueden introducir genes indicadores así como proteínas fluorescentes en las células huésped junto con la secuencia de ácido nucleico de interés, con el fin de determinar la eficiencia de la transformación.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un huésped procariota transformado con un vector de la presente invención. En una realización particular de la invención, el huésped procariota se transforma con el plásmido pBLL15 o el plásmido pAKL15E, preferiblemente con el plásmido pAKL15E que comprende dos región de

codificación diferentes en su casete de expresión dicistrónico para la expresión de una proteína heterodimérica secretada en dicha célula huésped tal como, por ejemplo, un Fab. Preferiblemente, dicha proteína heterodimérica es un Fab. En otra realización de la invención, el huésped procarionta se transforma con una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de la presente invención.

- 5 Una amplia variedad de células huésped procariontas son útiles en la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas de la presente invención. Estos huéspedes pueden incluir cepas de células Gram-negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas*, o células Gram positiva tales como *Bacillus* y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula huésped es una célula Gram-negativa, más preferiblemente una célula de *E. coli*. Las *E. coli* que se pueden usar son, por ejemplo las cepas TG1, W3110, DH1, XL1-Blue y Origami, que están disponibles comercialmente o se pueden obtener a través de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania). Lo más preferiblemente, se utiliza W3110. La célula huésped puede o no puede metabolizar melibiosa. Una célula huésped que es normalmente capaz de la absorción y de metabolizar melibiosa como *E. coli* podría modificarse para ser deficiente en una o más funciones relacionadas con la absorción y/o el metabolismo de la melibiosa. La deficiencia de una o más funciones relacionadas con la absorción y/o el metabolismo de melibiosa pueden lograrse, por ejemplo, por la supresión o el bloqueo de la expresión de un gen que codifica una proteína relacionada con la absorción y/o el metabolismo de melibiosa, tal como el gen *melA* que codifica para alfa-galactosidasa. Esto se puede hacer mediante técnicas conocidas tales como mutagénesis de transposón o mutación knock-out. Por lo general, el huésped procarionta corresponde a las secuencias de señal elegidas, por ejemplo, en caso de que se utilicen las secuencias de señal de *E. coli*, la célula huésped es usualmente un miembro de la misma familia de la enterobacteria, más preferiblemente la célula huésped es una cepa de *E. coli*.

Además se proporciona con la presente invención un método para producir un polipéptido en una célula huésped, que comprende las etapas de:

- a) construir un vector,
- 25 b) transformar un huésped procarionta con dicho vector,
- c) permitir la expresión de dicho polipéptido en un sistema de cultivo celular en condiciones adecuadas,
- d) recuperar dicho polipéptido a partir del sistema de cultivo celular.

El vector utilizado, así como su construcción y la transformación de un huésped procarionta son como se definen anteriormente, mientras que la secuencia heteróloga de ácido nucleico que se comprende por el vector codifica un polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido producido es un anticuerpo y más preferiblemente un fragmento Fab, mientras que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o el fragmento Fab se expresan en el sistema de cultivo celular en cantidades iguales, lo que conduce a altas concentraciones de anticuerpo funcional o fragmento Fab.

30 Como sistema de cultivo celular, un cultivo continuo o un cultivo discontinuo, tal como un cultivo en lote o cultivo discontinuo alimentado se pueden aplicar en tubos de cultivo, matraces de agitación o fermentadores bacterianos. Las células huésped son por lo general cultivadas en medios convencionales como se conoce en la técnica, tales como medios complejos como "medio de levadura de caldo nutritivo" o un glicerol que contiene medio como se describe por Kortz et al., 1995, *J. Biotechnol.* 39, 59-65 o un medio de sal mineral como se describe por Kulla et al., 1983, *Arch. Microbiol.* 135, 1. El medio preferido para llevar a cabo la expresión de dicho polipéptido es un medio que contiene glicerol, más preferiblemente el medio descrito por Kortz et al., 1995, *J. Biotechnol.* 39,59-65.

40 El medio podría modificarse como sea apropiado, por ejemplo, mediante la adición de ingredientes adicionales tales como tampones, sales, vitaminas o aminoácidos. También se pueden utilizar diferentes medios o combinaciones de medios durante el cultivo de las células. Preferiblemente, el medio utilizado como medio básico no debe incluir melibiosa, con el fin de lograr una regulación estricta de la región promotora de melibiosa. La melibiosa generalmente se añade después de que el cultivo ha alcanzado una DO_{600} apropiada dependiendo del sistema de cultivo. Por lo general, la cantidad de melibiosa en el medio del huésped procarionta cultivado está entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 10 g/l, más preferiblemente 1 y 5 g/l. Para el cultivo por lotes el OD_{600} usual es usualmente 0,4 o más alto. Intervalos de pH apropiados son, por ejemplo, 6-8, preferiblemente 7-7,5, las temperaturas de cultivo apropiadas están entre 10 y 40, preferiblemente entre 20 y 37°C. Las células se incuban por lo general tanto tiempo como sea necesario hasta que la máxima cantidad de producto expresado se ha acumulado, preferiblemente entre 1 hora y 20 días, más preferiblemente entre 5 horas y 3 días. La cantidad de producto expresado depende del sistema de cultivo utilizado. En un cultivo de matraz de agitación se puede producir normalmente un producto expresado en la cantidad de 0,5 g/l de medio de cultivo con un huésped transformado con el vector de la presente invención. Usando un cultivo de fermentador en un lote y/o modo de alimentación por lotes se puede obtener el producto expresado en una cantidad de, por lo general, más de 0,5 g/l de caldo de fermentación, preferiblemente más de 1 g/l, más preferiblemente más de 1,3 g/l.

Después de la expresión en la célula huésped, el producto expresado, tal como el polipéptido de interés puede entonces recuperarse a partir del cultivo de células huésped. Cuando el polipéptido de interés son cadenas de inmunoglobulina, la cadena pesada y la cadena ligera son normalmente cada una expresadas en la célula huésped y

secretadas al periplasma de la célula. Los péptidos señal codificados por las secuencias señal en el vector de expresión luego se procesan a partir de las cadenas de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras maduras luego se ensamblan para formar un anticuerpo intacto o un fragmento Fab. Con el fin de obtener un rendimiento máximo del producto expresado, las células se cosechan generalmente en el final del cultivo y se lisan, tales como por lisis por tratamiento con lisozima, sonicación o French Press. Por lo tanto, los polipéptidos se obtienen generalmente primero como lisado crudo de las células huésped. Se pueden purificar a continuación mediante procedimientos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica que pueden incluir precipitación diferencial, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio iónico, isoelectroenfoque, electroforesis en gel, y cromatografía de afinidad y de inmunofinidad. Estos métodos bien conocidos y practicados rutinariamente se describen en, por ejemplo, Ausubel et al., Supra., y Wu et al. (Eds.), Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology. Por ejemplo, para la purificación de inmunoglobulinas producidas de forma recombinante o fragmentos Fab, pueden ser purificadas con cromatografía de inmunofinidad mediante el paso a través de una columna que contiene una resina que tiene unida a la misma, moléculas diana a las que las inmunoglobulinas expresadas se puedan unir específicamente.

La descripción anterior se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

El genoma de Escherichia coli W3110 fue escaneado para operones regulados positivamente. Sobre la base de la información genómica, que está disponible en la base de datos KEGG (Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas, <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) fueron identificados y analizados promotores catabólicos regulados positivamente para su uso en plásmidos de expresión. Los promotores deben ser estrictamente regulados y se eligieron por un compuesto barato y no tóxico y por lo tanto industrialmente útil. Se eligieron los siguientes promotores de diferentes operones catabólicos regulados positivamente.

Construcción de plásmidos de expresión con promotores regulados positivamente

- promotor prp (propionato inducible)
- promotor gutA (glucitol inducible)
- promotor melAB2 (melibiosa inducible)

Los fragmentos de ADN precisos que contienen los elementos promotores fueron seleccionados en base a la información disponible en los sitios de unión del regulador correspondiente. El ADN cromosómico de Escherichia coli se aisló por el método de Pitcher et al., 1989, Letters in Applied Microbiology 8, 151-156. Los fragmentos del promotor se amplificaron a partir del ADN cromosómico de la cepa W3110 por PCR usando los siguientes cebadores. Los sitios de restricción de ClaI y AflII se subrayan. Las secuencias de los fragmentos son como sigue:

Pprp	Pprp-5	5' aaa <u>atc gat</u> aaa tga aac gca tat ttg 3'
	Pprp-3	5' aaa <u>ctt aag</u> ttg tta tca act tgt tat 3'

AAAATCGATAACTGAAACGCATATTTGCGGATTAGTTCATGACTTTATCTCTAACAAA
 TTGAAATTAACATTTAATTTTATTAAGGCAATTGTGGCACACCCCTTGCTTTGTCTTT
 ATCAACGCAAATAACAAGTTGATAACAACTTAAGTTT

PgutA	PgutA-5	5' aaa <u>atc gat</u> gca tca cgc ccc gca caa 3'
	PgutA-3	5' aaa <u>ctt aag</u> tca gga ttt att gtt tta 3'

AAAATCGATGCATCACGCCCGCACAAAGGAAGCGGTAGTCACTGCCCGATACGGAC
 TTTACATAACTCAACTCATTCCCCTCGCTATCCTTTTATTCAAACCTTTCAAATTAATA
 TTTATCTTTCAATTTGCGATCAAATAACACTTTTAAATCTTTCAATCTGATTAGATTAG
 GTTGCCGTTTGTAATAAAACAATAAATCCTGACTTAAGTTT

PmelAB2	PmelAB-5-1	5' aaa <u>atc gat</u> gac tgc gag tgg gag cac 3'
	PmelAB-3	5' aaa <u>ctt aag</u> ggc ttg ctt gaa taa ctt 3'

MeIR CRP

AAAATCGATACTCTGCTTTTCAGGTAATTTATTCCCATAAACTCAGATTACTGCTGC
CACGCAGGATCTGAGTTTATGGGAATGCTCAACCTGGAAGCCGGAGGTTTTCTGCA
 GATTGCCTGCCATGATGAAGTTATTCAAGCAAGCCCTTAAGTTT

+1

(El sitio de unión para CRP2 se resalta en color gris claro y los sitios de unión para MelR se resaltan en negro)

Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se aislaron mediante el kit de extracción por gel de QiaexII de Qiagen (Hilden, Alemania). Los fragmentos aislados se cortaron con ClaI y AflII y se ligaron a pBW22 ClaI/AflII-corte (Wilms et al., 2001, *Biotechnology and Bioengineering*, 73 (2), 95-103). El plásmido resultante que contiene el promotor melAB2 consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1 (pBLL7) que se muestra en la figura 1. Los plásmidos resultantes que contienen el promotor prp (pBLL5) y el promotor gutA (pBLL6) son idénticos a excepción de la región del promotor ligado. La secuencia de los fragmentos promotores insertados se confirmó por secuenciación (Microsynth GmbH, Balgach, Suiza).

Ejemplo 2

10 Construcción de los plásmidos de expresión del Fragmento Fab

Como una alternativa a un promotor lac inducible por IPTG (plásmido pMx9-HuCAL-Fab-H, Knappik et al., 1985, *Gene* 33, 103-119), se analizaron diferentes sistemas de expresión regulados positivamente por su capacidad para producir fragmentos de anticuerpos Fab-H. El fragmento Fab-H fue amplificado fuera del plásmido pMx9-HuCAL-Fab-H por PCR utilizando los cebadores Fab-5 (5'-aaa cat atg aaa aag aca gct atc-3') y Fab-3 (5'-aaa aag ctt tta tca gct ttt cgg ttc-3'). El fragmento de PCR se cortó con NdeI y HindIII y se insertó en pBW22 NdeI/HindIII-corte para crear el plásmido pBW22-Fab-H que contiene el promotor rhaBAD L ramnosa-inducible (Volf et al., 1996, *Mol. Microbiol.* 21,1037-1047). El mismo fragmento de PCR se insertó en los diferentes plásmidos de expresión con promotores inducibles. Los plásmidos de expresión pBLL15 resultantes (putativos) que contienen Fab-H y el promotor melAB2 (SEQ ID NO. 3) se muestran en la figura. 2. Se obtuvieron plásmidos equivalentes que contenían el promotor prp (pBLL13) y el promotor gutA (pBLL14). La secuencia del inserto Fab-H del plásmido pBW22-Fab-H fue confirmada por secuenciación.

Ejemplo 3

Expresión del fragmento Fab

La cepa W3110 (DSM 5911, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) se transformó con los diferentes plásmidos de expresión. Los plásmidos se aislaron a partir de los clones que resultaron de las diferentes transformaciones y se controlaron a través de análisis de restricción. Excepto el plásmido pBLL14, todos los plásmidos tuvieron el patrón de restricción esperado. El plásmido pBLL14 re-aislado mostró un tamaño y patrón de restricción alterado que fue sugerido que era debido a eventos de recombinación. Por lo tanto, la cepa W3110 (pBLL14) no fue probada en los siguientes ensayos. Las cepas restantes fueron probadas por su capacidad de secretar fragmentos de anticuerpos Fab-H plegados activamente. Esta prueba de la productividad se realizó, como se describe en el ejemplo 4. Los siguientes inductores se añadieron a una concentración de 0,2%

	pBW22-Fab-H	monohidrato de L (+) - ramnosa
	pBLL13	propionato de sodio
35	pBLL15	monohidrato de D (+) - Melibiosa
		monohidrato de D (+) - rafinosa
		D (+) - galactosa

Los resultados de los experimentos de hibridación en mancha se muestran en la figura 3.

Las cepas inducidas por de L-ramnosa y melibiosa W3110 (pBW22-Fab-H) y W3110 (pBLL15) mostraron prometedoros resultados de la hibridación en mancha: el aumento de las señales con el tiempo y casi ninguna actividad de fondo. La porción de los fragmentos de anticuerpos plegados activamente se cuantificó a través de ELISA. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de ELISA de los derivados W3110 con los diferentes plásmidos de expresión. El tiempo después de la inducción se indica. Se midieron los cultivos no inducidos después de 22 ó 25 h como controles no inducidos y los resultados de la cepa W3110 (pMx9-HuCAL-Fab-H) y TG1F' (pMx9-HuCAL-Fab-H) se utilizan como referencias. La concentración de Fab-H se da en mg/100 OD/L (n.d. no determinado)

plásmido	inductor	8 h	11,5/12 h	22/25 h	22/25 h
		inducido			no inducido
en TG1F'					
pMx9-HuCAL-Fab-H	IPTG	nd	Nd	68,64	84.56

plásmido	inductor	8 h	11,5/12 h	22/25 h	22/25 h
en W3110					
pMx9-HuCAL-Fab-H	IPTG	nd	Nd	140,56	8,14
pBW22-Fab-H	ramnosa	176,88	259,56	328,62	6,52
pBLL13	propionato	nd	0,84	0,90	3,94
pBLL15	melibiosa	2,89	145,10	504,28	4,28

5 Todas las cepas crecieron bien sin ninguna inhibición de crecimiento en presencia o ausencia del inductor correspondiente hasta DO₆₀₀ entre 4 y 6. Los plásmidos de expresión pBW22-Fab-H y pBLL15 llevaron a los títulos más altos de fragmentos de anticuerpos después de la inducción durante la noche. La cepa inducida por melibiosa W3110 (pBLL15) mostró un aumento retardado en la formación de fragmentos de anticuerpos activos en comparación con el sistema inducido por L-ramnosa (pBW22-Fab-H).

10 La cepa inducible por L-ramnosa W3110 (pBW22-Fab-H) se ensayó en el Sistema de Control de la Actividad de Respiración (RAMOS, ACBiotec, Jülich, Alemania), un sistema de medición novedoso para la determinación en línea de actividades de respiración en matraces de agitación. En comparación con el experimento del matraz de agitación normal, el título de anticuerpos (que se midió a través de ELISA) se duplicó (703,64 mg/L/100 DO₆₀₀ después de 23 h de inducción). El crecimiento optimizado utilizando el equipo RAMOS favorece la producción de fragmentos de anticuerpos activos.

Ejemplo 4

Inducción de melibiosa en matraces de agitación

15 Se ensayó W3110 de E. coli que lleva el plásmido pBLL15 para determinar su capacidad de producir fragmentos de anticuerpos Fab-H plegados activamente. Se diluyeron (1:50) cultivos de una noche [en medio NYB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro de sodio) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 37°C.] en 20 ml de medio de glicerol fresco (como se describe por Kortz et al., 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65, mientras que se utilizó la solución de vitaminas, como se describe por Kulla et al., 1983, Arch. Microbiol, 135, 1 y se incubó a 30°C. Se añadió melibiosa (0,2%) cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Se tomaron 20 muestras (1 ml) a diferentes intervalos de tiempo, se centrifugaron y se almacenaron los sedimentos a -20°C. Las células congeladas fueron lisadas de acuerdo con el tratamiento con lisozima descrito anteriormente y los sobrenadantes se analizaron en hibridación en mancha y ensayos ELISA. Se obtuvieron 504,28 mg/L/100 DO₆₀₀ de fragmentos de anticuerpos Fab-H funcionales.

Ejemplo 5

25 Ocurrencia de agregados de alto peso molecular

30 Con el fin de averiguar si se producen agregados de alto peso molecular, se llevó a cabo la transferencia Western de extractos de cepa W3110 (pBLL15), la cual mostró el título de anticuerpos más alto (Tabla 1), utilizando el conjugado de Fab-H + AP anti-humano. El cultivo se realizó como se describe en el ejemplo 4. Las muestras fueron tomadas después de 9, 12 y 23 horas después de la inducción con melibiosa. La transferencia Western de extractos de lisozima de las cepas W3110 (pBLL15) utilizando el conjugado de Fab-H + AP anti-humano se muestra en la figura 4. Las concentraciones más bajas de los agregados de alto peso molecular corresponden a los títulos más altos de los fragmentos de anticuerpos funcionales. La elección del sistema de expresión parece influir en la manera en que se forman los fragmentos de anticuerpo: funcional o en agregados.

Ejemplo 6

35 Influencia de los péptidos señal

40 Se utilizó la base de datos del genoma de E. coli para buscar los péptidos señal útiles que podrían ser utilizados en combinación con los fragmentos de Fab-H VL3-CL y VH-CH. Se eligieron las secuencias señal de las proteínas periplásmicas de unión para azúcares, aminoácidos, vitaminas e iones. Estas proteínas periplásmicas representan un grupo relativamente homogéneo que ha sido más ampliamente estudiado que otras proteínas periplásmicas. Puesto que son generalmente abundantes sus secuencias señal tienen que asegurar un transporte eficiente a lo largo de la membrana interna en el periplasma. Todas las combinaciones posibles del péptido señal Fab se comprobaron por su probabilidad del péptido de secuencia y del sitio de escisión utilizando el servidor web SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/#submission>) como se muestra en la siguiente Tabla 2.

ES 2 612 545 T3

Péptido señal		Probabilidad del péptido señal	Probabilidad del sitio de escisión max
OmpA (E. coli) - proteína de la membrana externa precursora			
MKKTA IAIIV ALAGF ATVAQ A	APKDN (OmpA)	1,000	0,993
MKKTA IAIIV ALAGF ATVAQ A	DIELT (OmpA-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,971
PhoA (E. coli) precursor de la fosfatasa alcalinizada			
VKQST IALAL LPLLF TPVTK A	RTPEM (PhoA)	0,996	0,765
MKQST IALAL LPLLF TPVTK A	QVQLK (PhoA-VH-CH, Fab-H)	0,999	0,784
PelB (Erwinia chrysantemi) precursor de pectato liasa			
MKSLI TPITA GLLLA LSQPL LA	ATDTG (PelB)	1,000	0,999
MKSLI TPITA GLLLA LSQPL LA	DIELT (pelB- VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,998
MKSLI TPITA GLLLA LSQPL LA	QVQLK (PelB-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,998
PelB (Erwinia carotovora)- Precursor de pectato liasa			
MKYLL PTAAA GLLLL AAQPA MA	ANTGG (PelB)	1,000	1,000
MKYLL PTAAA GLLLL AAQPA MA	DIELT (PelB- VL3-CL, Fab-H)	1,000	1,000
MKYLL PTAAA GLLLL AAQPA MA	QVQLK (PelB-VH-CH, Fab-H)	1,000	1,000
PelB (Xanthomonas campestris) - Precursor de pectato liasa			
MKPKF STAAA ASLFV GSLLV IGVAS A	DPALE (PelB)	1,000	0,993
MKPKF STAAA ASLFV GSLLV IGVAS A	DIELT (pelB- VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,985
MKPKF STAAA ASLFV GSLLV IGVAS A	QVQLK (PelB-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,988
Lamb (E. coli) - Precursor de maltoporin (proteína del receptor lambda)			
MMITL RKLPL AVAVA AGVMS AQAMA	VDFHG (Lamb)	1,000	0,975
MMITL RKLPL AVAVA AGVMS AQAMA	DIELT (Lamb-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,979
MM/TL RKLPL AVAVA AGVMS AQAMA	QVQLK (Lamb-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,988
MalE (E. coli) - Precursor de la proteína de unión a maltosa			
MKIKT GARIL ALSAL TTMMF SASAL A	KIEEG (MalE)	1,000	0,956
MKIKT GARIL ALSAL TTMMF sasal A	DIELT (MalE-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,978
MKIKT GARIL ALSAL TTMMF sasal A	QVQLK (MalE-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,990
Bla (pBR322) (E. coli) -beta-lactamasa			
MSIQH FRVAL IPFFA AFCLP VFA	HPETL (Bla)	1,000	1,000
MSIQH FRVAL IPFFA AFCLP VFA	DIELT (Bla-VL3-CL, Fab-H)	1,000	1,000

ES 2 612 545 T3

Péptido señal		Probabilidad del péptido señal	Probabilidad del sitio de escisión max
MSIQH FRVAL IPFFA AFCLP VFA	QVQLK (Bla-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,999
OppA (E. coli) - Proteína de unión de oligopéptidos periplásmica			
MTNIT KRSLV AAGVL AALMA GNVAL A	ADVPA (OppA)	1,000	0,996
MTNIT KRSLV AAGVL AALMA GNVAL A	DIELT (OppA-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,911
MTNIT KRSLV AAGVL AALMA GNVAL A	QVQLK (OppA-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,984
Trea (E. coli) - Precursor de trehalasa periplásmica (alfa-trehalosa glucohidrolasa)			
MKSPA PSRPQ KMALI PACIF LCFAA	EETPV (TreA)	1,000	0,996
LSVQA MKSPA PSRPQ KMALI PACIF LCFAA	DIELT (TreA-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,961
LSVQA	QVQLK (TreA-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,989
MPPA (E. coli) - Precursor de la proteína de unión al péptido mureína periplásmico			
MKHSV SVTCC ALLVS SISLS YA	AEVPS (MppA)	1,000	0,943
MKHSV SVTCC ALLVS SISLS YA	DIELT (MppA-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,906
MKHSV SVTCC ALLVS SISLS YA	QVQLK (MppA-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,938
BglX (E. coli) - Precursor de beta-glicosidasa periplásmico			
MKWLC SVGIA VSLAL QPALA	DDLFG (BglX)	1,000	0,999
MKWLC SVGIA VSLAL QPALA	DIELT (BglX-VL3-CL, Fab-H)	0,999	0,999
MKWLC SVGIA VSLAL QPALA	QVQLK (BglX-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,996
ArgT (E. coli) - Precursor de la proteína periplásmica de unión a lisina-arginina-ornitina			
MKKSI LALSL LVGLS TAASS YA	ALPET	1,000	0,929
MKKSI LALSL LVGLS TAASS YA	DIELT (ArgT-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,947
MKKSI LALSL LVGLS TAASS YA	QVQLK (ArgT-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,960
MaIS (E. coli) - Precursor de alpha-amilasa			
MKLAA CFLTL LPGFA VA	ASWTS (Mals)	1,000	0,794
MKLAA CFLTL LPGFA AV	DIELT (Mals-VL3-CL, Fab-H)	0,998	0,995
MKLAA CFLTL LPGFA AV	QVQLK (Mals-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,990
HisJ (E. coli)- Precursor de la proteína periplásmica de unión a histidina			
MKKLV LSLSL VLAFS SATAA FA	AIPQN (HisJ)	1,000	0,994
MKKLV LSLSL VLAFS SATAA FA	DIELT (HisJ-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,957
MKKLV LSLSL VLAFS SATAA FA	QVQLK (HisJ-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,988

ES 2 612 545 T3

Péptido señal		Probabilidad del péptido señal	Probabilidad del sitio de escisión max
XYF (E. coli) - Precursor de la proteína periplásmica de unión a D-xilosa			
MKIKN ILLTL CTSLL LTNVA AHA	KEVKI (XylF)	1,000	0,996
MKIKN ILLTL CTSLL LTNVA AHA	DIELT (XylF-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,992
MKIKN ILLTL CTSLL LTNVA AHA	QVQLK (XylF-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,996
FecB (E. coli) - Precursor de la proteína periplásmica de unión de dicitrato de hierro (III)			
MLAFI RFLFA GLLLV ISHAF A	ATVQD (FecB)	1,000	0,975
MLAFI RFLFA GLLLV ISHAF A	DIELT (FecB-VL3-CL, Fab-H)	1,000	0,989
MLAFI RFLFA GLLLV ISHAF A	QVQLK (FecB-VH-CH, Fab-H)	1,000	0,990

Se eligieron las siguientes seis combinaciones:

- LamB-VL3-CL (precursor de la maltoporina)
- MalE-VH-CH (precursor de la proteína de unión a maltosa)
- Bla-VL3-CL (beta-lactamasa)
- 5 - TReA-VH-CH (precursor de trehalasa periplásmica)
- ArgT-VL3-CL (precursor de la proteína periplásmica de unión a lisina-arginina-ornitina)
- FecB-VH-CH (precursor de la proteína periplásmica de unión a dicitrato de hierro (III))

Las fusiones de genes que generan el péptido señal (SP) para las fusiones VL3-CL y VH-CH se llevaron a cabo con la superposición de los cebadores de PCR y se resumen en la siguiente la Tabla de amplificación 3.

Cebador	Plantilla	Fragmento
LamB-VL3-CL		
lamB-5 Lamb-3	ADN genómico de E. coli W3110	lamB-SP
lamB-VL3-5 VL3-3	pMx9-HuCAL-Fab-H-S-S	VL3-CL
lamB-5 VL3-3	lamB-SP / VL3-CL	lamB-VL3-CL
MalE-VH-CH		
malE-5 male-3	ADN genómico de E. coli W3110	malE-SP
malE-VH-CH VH-3	pMx9-HuCAL-Fab-H	VH-CH
malE-5 VL3-3	malE-SP / VH-CH	malE-VH-CH
Bla-VL3-CL		
bla-5 bla-3	ADN genómico de E. coli W3110	bla-SP
bla-VL3-5 VL3-3	pMx9-HuCAL-Fab-H-S-S	VL3-CL
bla-5 VL3-3	bla-SP / VL3-CL	bla-VL3-CL
TreA-VH-CH		
treA-5 treA-3	ADN genómico de E. coli W3110	treA-SP
treA-VH-CH VH-3	pMx9-HuCAL-Fab-H-S-S	VH-CH
treA-5 VH-3	treA-SP / VH-CH	treA-VH-CH

Cebador	Plantilla	Fragmento
ArgT-VL3-CL		
argT-5 argT-3	ADN genómico de E. coli W3110	argT-SP
argT-VL3-5 VL3-3	pMx9-HuCAL-Fab-H	VL3-CL
argT-5 VL3-3	argT-SP / VL3-CL	argT-VL3-CL
FecB-VH-CH		
fecB-5 fecB-3	ADN genómico de E. coli W3110	fecB-SP
fecB-VH-CH VL3-3	pMx9-HuCAL-Fab-H-S-S	VH-CH
fecB-5 VL3-3	fecB-SP / VH-CH	fecB-VH-CH

5 Las fusiones de las secuencias del péptido señal con las secuencias VL3-CL y VH-CH se realizaron como se describe en otro lugar (Horton, RM, Hunt, HD, Ho, SN, Pullen, JK y Pease, LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene 77, 61-68). Los genes SP-VL3-CL se cortaron con enzimas de restricción NdeI y PstI y se ligaron en NdeI/PstI corte pBW22 y en pBLL7. Los plásmidos resultantes se cortaron con PstI y HindIII y se ligaron a los genes PstI/HindIII corte SP-VH-CH. Ya que la integración de los genes bla-VL3-CL y FecB-VH-CH no fue posible solo el plásmido de expresión de Fab-H que contiene los genes lamB-VL3-CL y malE-VH-CH pudo ponerse a prueba. Se obtuvo un plásmido de expresión de lamB-VL3-CL/malE-VH-CH que contiene el promotor inducible por L-ramnosa (pAKL14). Los genes Lamb-VL3-CL/malE-VH-CH que fueron aislados del plásmido pAKL15 (ejemplo 7) como el fragmento AflII/HindIII se ligaron en AflII/HindIII-corte pBLL7 para obtener pAKL15E. La Fig. 5 ilustra el plásmido de expresión pAKL15E que contiene el promotor inducible por melibiosa y lamB-VL3-CL/malE-VH-CH (SEQ ID. NO. 4).

Ejemplo 7

Influencia de las regiones de inicio de la traducción sobre la expresión de Fab

15 Los genes Fab-H del plásmido pAKL14 y el plásmido pAKL15E contienen la misma secuencia de ADN 5' del codón de inicio (región de iniciación de la traducción) mientras que en el plásmido original pMx9-HuCAL-Fab-H las regiones de iniciación de la traducción de ambos genes Fab-H son diferentes. Una comparación de las regiones de iniciación de la traducción de las secuencias del plásmido pMx9-HuCAL-Fab-H y pAKL14/pAKL15E se muestra en la siguiente Tabla 4:

	pMx9-HuCAL-Fab-H	ompA-VL3-CL	gagggcaaaaa	atg
20		phoA-VH-CH	aggagaaaataaa	atg
	pAKL14/pAKL15E	lamB-VL3-CL	aggagatatacat	atg
		malE-VH-CH	aggagatatacat	atg

25 La productividad de la cepa W3110 (pAKL14) se probó en matraces de agitación como se describe en el ejemplo 4. La cepa creció bien en presencia o ausencia de L-ramnosa. Eso significa que la producción de Fab-H no influyó en la viabilidad de las células.

30 Las nuevas construcciones del péptido señal (en combinación con las señales de iniciación de la traducción modificada) de nuevo aumentaron el título del fragmento del anticuerpo de 328,62 mg/L/100 DO₆₀₀ (plásmido pBW22-Fab-H que contiene la construcción del gen MOR a partir del plásmido pMx9-HuCAL-Fab-H) a 596,14 mg/L/100 DO₆₀₀ (plásmido pAKL14) y a 878,86 mg/L/100 DO₆₀₀ (plásmido pAKL15E). La secuenciación de los genes de lamB-VL3-CL y malE-VH-CH en pAKL14 reveló tres intercambios de bases que se supone que se deben a la construcción de los genes de fusión por dos reacciones de PCR consecutivas. Los intercambios de bases dieron lugar a los siguientes cambios de aminoácidos (los aminoácidos incorrectos son enfatizados):

VL3-CL (pAKL14) -pI = 4,85

**MMITLRKPLAVAVAAGVMSAQAMADIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGNALGDK
YASWYQQNPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY
CQSYDSPQVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTEA**

VH-CH (pAKL14) -pI = 9,52

**MKIKTGARILALSALTTMMFSASALAQVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLST
SGVGVGWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTN
MDPVDATATYYCARYPVTQRSYMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**

- 5 La cadena ligera de Fab-H lleva dos errores (D50N, K63N) y la cadena pesada un cambio de aminoácido (F156L). Para restaurar la secuencia de Fab-H original, dos fragmentos del plásmido pAKL14 (fragmento 138 bp SexAI/BamHI y 310 bp BssHII/HindIII) se intercambiaron contra los fragmentos homólogos del plásmido pBW22-Fab-H (que lleva la secuencia del gen Fab-H sin cambios). El plásmido resultante pAKL15 lleva la secuencia Fab-H correcta. El intercambio de los tres aminoácidos no tuvo efecto aparente en las propiedades globales de Fab-H ya que el pI fue sin cambio. Por lo tanto, la capacidad de la cepa W3110 (pAKL15) para producir fragmentos de anticuerpos Fab-H funcionales se supuso que era similar a la cepa W3110 (pAKL14) y no fue analizada.

La productividad del fragmento de anticuerpo Fab-H se pudo aumentar utilizando diferentes estrategias de optimización. La siguiente Tabla 5 resume las mejoras:

Cepa	Mejora	Concentración del anticuerpo Fab-H funcional (mg/L/100 OD)	Incremento de actividad
TG1F' (pMx9-HuCAL-Fab-H)	cepa MOR	84,56	
W3110 (pMx9-HuCALFab-H)	Línea de fondo de la cepa	140,45	1,7
W3110 (pBW22-Fab-H)	Sistema de expresión (Ramnosa)	328,62	3,9
W3110 (pBLL15)	Sistema de expresión (Melibiosa)	504,28	6
W3110 (pAKL14)	Traducción del péptido señal (Ramnosa)	596,14	7
W3110 (pAKL15E)	Traducción del péptido señal (Melibiosa)	878,86	10,4

- 15 Las cepas que produjeron altos títulos de anticuerpos Fab-H se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 6). Las concentraciones más altas funcionales de Fab-H se midieron en cepas que produjeron una cantidad equilibrada de cadena ligera y pesada (carriles 4 y 5). Las cepas inducibles de L-ramnosa, que llevan el fragmento Fab-H tales como W3110 (pBW22-Fab-H) (carril 3) sobreproducen fuertemente la cadena ligera.

Ejemplo 8

Inducción de melibiosa en matraces de agitación

- 20 Se ensayó W3110 de E. coli que lleva el plásmido pAKL15E para determinar su capacidad de producir fragmentos de anticuerpos Fab-H plegados activamente. Se diluyeron (1:50) cultivos de una noche [en medio NYB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro de sodio) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 37°C.] en 20 ml de medio de glicerol fresco (como se describe por Kortz et al., 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65, mientras que se utilizó la solución de vitaminas, como se describe por Kulla et al., 1983, Arch. Microbiol. 135, 1 y se incubó a 30°C. Se añadió melibiosa (0,2%) cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Se tomaron muestras (1 ml) a diferentes intervalos de tiempo, se centrifugaron y se almacenaron los sedimentos a -20°C. Las

células congeladas fueron lisadas de acuerdo con el tratamiento con lisozima descrito anteriormente y los sobrenadantes se analizaron en SDS-PAGE y ensayos de ELISA. La cepa inducible de melibiosa que lleva los genes Fab-H con los péptidos señal alterados (Lamb-VL3-CL/malE-VH-CH) mostró los títulos más altos de anticuerpos Fab-H (Tabla 5). Las cadenas ligera y pesada de Fab-H fueron producidas en cantidades iguales (Fig. 8).

Ejemplo 9

Inducción de melibiosa de una amidasa de la cepa KIE153 (*Burkholderia* sp. DSM9925) en matraces de agitación

Se ensayó W3110 de *E. coli* que lleva el plásmido pJKL8 (Fig. 7) para determinar su capacidad para convertir piperazina-2-carboxamida racémica a ácido (R)-piperazina-2-carboxílico. Se diluyeron (1:50) cultivos de una noche [en medio NYB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro de sodio) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 30°C.] en 20 ml de medio de glicerol fresco (como se describe por Kortz et al., 1995, *J. Biotechnol.* 39, 59-65, mientras que se utilizó la solución de vitamina como se describe por Kulla et al., 1983, *Arch. Microbiol.* 135, 1 y se incubó a 30°C. Se añadió melibiosa (0,2%) cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8. Después de un tiempo de inducción de 19 h las células se recogieron y se almacenaron a -20°C. La actividad de amidasa se ensayó como se describe en Eichhorn et al. 1997, *Tetrahedron Asymmetry*, 8 (15), 2533-36. El resto de las células convirtió de forma enantioselectiva (R)-piperazina-2-carboxamida en ácido (R)-piperazina-2-carboxílico con una tasa de conversión de aproximadamente 1 g/h/OD₆₀₀.

Ejemplo 10

Inducción de melibiosa de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv, S1) en matraces de agitación

El gen scFv fue aislado vía PCR utilizando los cebadores 5-S (5'-aaa cat atg aaa tac cta ttg cct acg gc-3') y 3-S1 (5'-aaa aag ctt act acg agg aga cgg-3'). La proteína S1 correspondiente contiene una secuencia señal PelB que es responsable del transporte de la proteína al periplasma de *E. coli*. El fragmento de PCR se cortó con NdeI y HindIII y se insertó en NdeI/pBLL7 corte HindIII para crear el plásmido pBLL7-pelB1-S1 que contiene el promotor melAB2 inducible de melibiosa (Fig. 9). La secuencia del inserto S1 del plásmido pBLL7-S1 fue confirmada por secuenciación. La cepa W3110 (DSM 5911, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) se transformó con el plásmido pBLL7-pelB1-S1. Los plásmidos se aislaron a partir de diferentes clones y se verificaron por análisis de restricción. W3110 de *E. coli* (pBLL7-pelB-S1) se probó por su capacidad para producir S1 soluble. Se diluyeron (1:50) cultivos de una noche [en medio NYB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro de sodio) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 37°C] en 20 ml de medio de glicerol fresco [como se describe por Kortz et al., 1995, *J. Biotechnol.* 39, 59-65, con la excepción de la solución de vitamina (como se describe por Kulla et al., 1983, *Arch. Microbiol.* 135, 1)] y se incubaron a 30°C. Se añadió Melibiosa (0,2%) cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Se tomaron muestras (1 ml) a diferentes intervalos de tiempo, se centrifugaron y se almacenaron los sedimentos a -20°C. Las células congeladas fueron lisadas de acuerdo con el tratamiento con lisozima descrito anteriormente y se analizaron los sobrenadantes y peletes de proteínas insolubles mediante SDS-PAGE (Fig. 10) y Bioanalyzer. La mayoría de la proteína S1 (1,7 g/Lx mg/L100 OD₆₀₀) fue producida en la fracción de la proteína soluble.

Listado de Secuencias

<110> LONZA AG
MORPHOSYS AG

<120> Sistema de expresión del operón melibiosa

<130> B14868/EP

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 143

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> característica_nueva

<223> promotor melAB2

<400> 1

ES 2 612 545 T3

actctgcttt tcaggtaatt tattcccata aactcagatt tactgctgct tcacgcagga 60
tctgagttta tgggaatgct caacctggaa gccggagggtt ttctgcagat tcgcctgcca 120
tgatgaagtt attcaagcaa gcc 143

<210> 2
<211> 13
<212> ADN
5 <213> Escherichia coli

<220>
<221> característica_nueva
<223> Región de iniciación de la traducción

<400> 2
10 aggatata cat 13

<210> 3
<211> 1630
<212> ADN
<213> Escherichia coli

15 <220>
<221> característica_nueva
<223> Secuencia que contiene el promotor melAB2 y ompA-VL3-CL y phoA-VH-CH

<400> 3
atcgatactc tgcttttcag gtaatttatt cccataaact cagatttact gctgcttcac 60
gcaggatctg agtttatggg aatgctcaac ctggaagccg gaggttttct gcagattcgc 120
ctgccatgat gaagttatc aagcaagccc ttaagaagga gatatacata tgaaaaagac 180

ES 2 612 545 T3

agctatcgcg attgcagtgg cactggctgg tttcgctacc gtagcgcagg ccgatatcga 240
 actgacctcag ccgccttcag tgagcgttgc accaggtcag accgcgcgta tctcgtgtag 300
 cggcgatgcg ctgggcgata aatacgcgag ctggtaccag cagaaaccg ggcaggcgcc 360
 agttctggtg atttatgatg attctgaccg tccctcaggc atcccggaac gcttttagcgg 420
 atccaacagc ggcaacaccg cgaccctgac cattagcggc actcaggcgg aagacgaagc 480
 ggattattat tgccagagct atgactctcc tcaggttgtg tttggcggcg gcacgaagtt 540
 aaccgttctt ggccagccga aagccgcacc gagtgtgacg ctgtttccgc cgagcagcga 600
 agaattgcag gcgaacaaag cgaccctggt gtgcctgatt agcgactttt atccgggagc 660
 cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac 720
 accctcaaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga 780
 gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgagggga gcaccgtgga 840
 aaaaaccgtt gcgccgactg aggcctgata agcatgcgta ggagaaaata aaatgaaaca 900
 aagcactatt gcactggcac tcttaccgtt gctcttcacc cctgttacca aagcccaggt 960
 gcaattgaaa gaaagcggcc cggccctggt gaaaccgacc caaacctga cctgacctg 1020
 taccttttcc ggatttagcc tgtccacgtc tggcgttggc gtgggctgga ttcgccagcc 1080
 gcctgggaaa gccctcgagt ggctggtctt gattgattgg gatgatgata agtattatag 1140
 caccagcctg aaaacgcgtc tgaccattag caaagatact tcgaaaaatc aggtgggtgct 1200
 gactatgacc aacatggacc cggtgatac ggccacctat tattgcgcgc gttatcctgt 1260
 tactcagcgt tcttatatgg atgtttgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctcagc 1320
 gtogacaaa ggtccaagcg tgtttccgct ggctccgagc agcaaaagca ccagcggcgg 1380
 cacggctgcc ctgggctgcc tggtaaaga ttatttcccg gaaccagtca ccgtgagctg 1440
 gaacagcggg gcgctgacca gggcgtgca tacctttccg gcggtgctgc aaagcagcgg 1500
 cctgtatagc ctgagcagcg ttgtgaccgt gccgagcagc agcttaggca ctcagacct 1560
 tatttgcaac gtgaaccata aaccgagcaa caccaaagtg gataaaaaag tggaaccgaa 1620
 aagctgataa 1630

<210> 4

<211> 1659

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<220>

<221> característica_nueva

<223> Secuencia que contiene el promotor melAB2 y lamB-VL3-CL y malE-VH-CH

<400> 4

ES 2 612 545 T3

atcgatactc	tgcttttcag	gtaatttatt	cccataaact	cagatttact	gctgcttcac	60
gcaggatctg	agtttatggg	aatgctcaac	ctggaagccg	gaggttttct	gcagattcgc	120
ctgccatgat	gaagttattc	aagcaagccc	ttaagaagga	gatatacata	tgatgattac	180
tctgcgcaaa	cttcctctgg	cggttgccgt	cgcagcgggc	gtaatgtctg	ctcaggcaat	240
ggctgatata	gaactgaccc	agccgccttc	agtgagcgtt	gcaccaggtc	agaccgcgcg	300
tatctcgtgt	agcggcgatg	cgctgggcga	taaatacgcg	agctggtacc	agcagaaacc	360
cgggcaggcg	ccagttctgg	tgatttatga	tgattctgac	cgteccctcag	gcatcccgga	420
acgctttagc	ggatccaaca	gcggaacac	cgcgaccctg	accattagcg	gactcaggc	480
ggaagacgaa	gcggtattatt	attgccagag	ctatgactct	cctcaggttg	tgtttgcgcg	540
cggcacgaag	ttaaccgttc	ttggccagcc	gaaagccgca	ccgagtgtga	cgctgtttcc	600
gccgagcagc	gaagaattgc	aggcgaacaa	agcgaacctg	gtgtgcctga	ttagcgactt	660
ttatccggga	gccgtgacag	tggcctggaa	ggcagatagc	agccccgtca	aggcgggagt	720
ggagaccacc	acaccctcca	aacaaagcaa	caacaagtac	gcggccagca	gctatctgag	780
cctgacgcct	gagcagtgga	agtcccacag	aagctacagc	tgccagggtca	cgcattgaggg	840
gagcacocgtg	gaaaaaacgg	ttgcgccgac	tgaggcctga	taactgcagg	agatatacat	900
atgaaaataa	aaacaggtgc	acgcatcctc	gcattatccg	cattaacgac	gatgatgttt	960
tccgcctcgg	ctctcgccca	ggtgcaattg	aaagaaagcg	gcccggccct	ggtgaaaaccg	1020
acccaaaacc	tgaccctgac	ctgtaccttt	tccggattta	gcctgtccac	gtctggcggt	1080
ggcgtgggct	ggattcgcca	gccgcctggg	aaagccctcg	agtggctggc	tctgattgat	1140
tgggatgatg	ataagtatta	tagcaccagc	ctgaaaacgc	gtctgaccat	tagcaaagat	1200
acttcgaaaa	atcaggtggt	gctgactatg	accaacatgg	acccggtgga	tacggccacc	1260
tattattgcg	cgogttatcc	tgttactcag	cgttcttata	tggatgtttg	ggccaaggc	1320
accctgggtg	cggttagctc	agcgtcgacc	aaaggtccaa	gcgtgtttcc	gctggctccg	1380
agcagcaaaa	gcaccagcgg	cggcacggct	gcctgggct	gcctgggtaa	agattatttc	1440
ccggaaccag	tcaccgtgag	ctggaacagc	ggggcgctga	ccagcggcgt	gcataccttt	1500
ccggcgggtg	tgcaaagcag	cggcctgtat	agcctgagca	gcgttgtgac	cgtgccgagc	1560
agcagcttag	gactcagac	ctatatttgc	aacgtgaacc	ataaaccgag	caacaccaaa	1620
gtggataaaa	aagtggaacc	gaaaagctga	taaaagctt			1659

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector expresable en un huésped que comprende el promotor melAB del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped y una secuencia señal operativamente unida a dicha secuencia de ácido nucleico y que codifica un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en los péptidos señal de E. coli LamB, MalE, OmpA y PhoA, en donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se controla por dicho promotor melAB y en donde dicho promotor melAB es deficiente en el sitio de unión CRP1.
2. El vector de la reivindicación 1, en el que dicho promotor melAB deficiente en el sitio de unión CRP1 consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia complementaria de la misma.
- 10 3. El vector de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha unidad transcripcional además comprende una región de iniciación de la traducción aguas arriba del punto de iniciación de la traducción de dicha unidad transcripcional, consistiendo dicha región de iniciación de la traducción en la secuencia AGGAGATATACAT (SEQ ID NO. 2), en donde dicha región de iniciación de la traducción está unida operativamente a dicha secuencia de ácido nucleico.
- 15 4. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha unidad transcripcional comprende además una región de terminación de la transcripción que es la secuencia del terminador de la transcripción rrnB.
5. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido.
6. El vector de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica un anticuerpo.
7. El vector de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica un fragmento Fab.
- 20 8. El vector de la reivindicación 7, en el que la cadena pesada y ligera de dicho fragmento Fab se codifican por una unidad transcripcional dicistrónica, mientras que cada cadena está unida operativamente a una secuencia señal y una región de iniciación de la traducción idéntica aguas arriba del punto de iniciación de la traducción de dicha unidad transcripcional.
- 25 9. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho promotor y dicha unidad de transcripción unida operativamente comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 o una secuencia complementaria de la misma.
10. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho promotor y dicha unidad transcripcional unida operativamente comprende la secuencia SEQ ID NO. 4, una secuencia complementaria de la misma.
11. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho vector es un plásmido autónomo o autorreplicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus.
- 30 12. El uso el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para la expresión heteróloga regulada de una secuencia de ácido nucleico en un huésped procarionta.
13. El uso del vector de la reivindicación 12, en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica para un polipéptido.
- 35 14. El uso del vector de la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido es un fragmento Fab, mientras que las cadenas pesadas y ligeras del fragmento Fab se expresan en cantidades iguales.
15. Una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada expresable en un huésped que comprende el promotor melAB del operón melibiosa unido operativamente a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga a dicho huésped, y una secuencia señal operativamente unida a dicha secuencia de ácido nucleico y que codifica un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en los péptidos señal de E. coli LamB, MalE, OmpA y PhoA, en donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se controla por dicho promotor melAB y en donde dicho promotor melAB es deficiente en el sitio de unión CRP1.
- 40 16. La secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de la reivindicación 15, en donde dicho promotor melAB deficiente en el sitio de unión CRP1 consiste en la secuencia SEQ ID NO. 1, una secuencia complementaria de la misma.
- 45 17. La secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de la reivindicación 15, en donde dicho promotor y dicha unidad de transcripción unida operativamente comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 o una secuencia complementaria de la misma.
- 50 18. La secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de la reivindicación 15, en donde dicho promotor y dicha unidad de transcripción unida operativamente comprende la secuencia SEQ ID NO. 4 o una secuencia complementaria de la misma.

19. Un huésped procariota transformado con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

20. Un huésped procariota transformado con la secuencia de ácido nucleico aislada y purificada de cualquiera de las reivindicaciones 15-18.

21. Un método para producir un polipéptido en un huésped, que comprende las etapas de:

- 5
- a) construir un vector de cualquiera de las reivindicaciones 5-11,
 - b) transformar un huésped procariota con dicho vector,
 - c) permitir la expresión de dicho polipéptido en un sistema de cultivo celular en condiciones adecuadas, y
 - d) recuperar dicho polipéptido a partir del sistema de cultivo celular.

10 22. El método de la reivindicación 21, en donde el polipéptido producido es un fragmento Fab, mientras que las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab se expresan en dicho sistema de cultivo celular en cantidades iguales.

23. El método de la reivindicación 21 ó 22, en donde la expresión de dicho polipéptido se lleva a cabo en un medio que contiene glicerol.

Figura 1

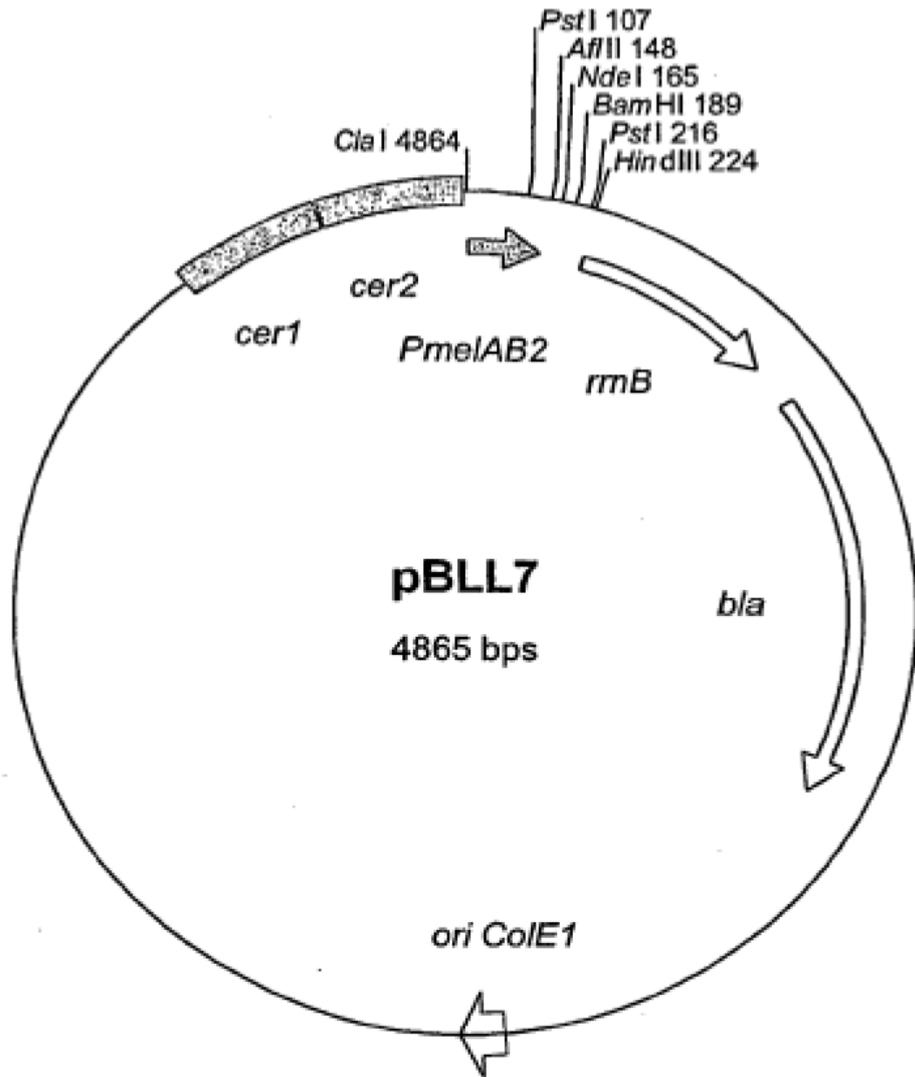


Figura 2

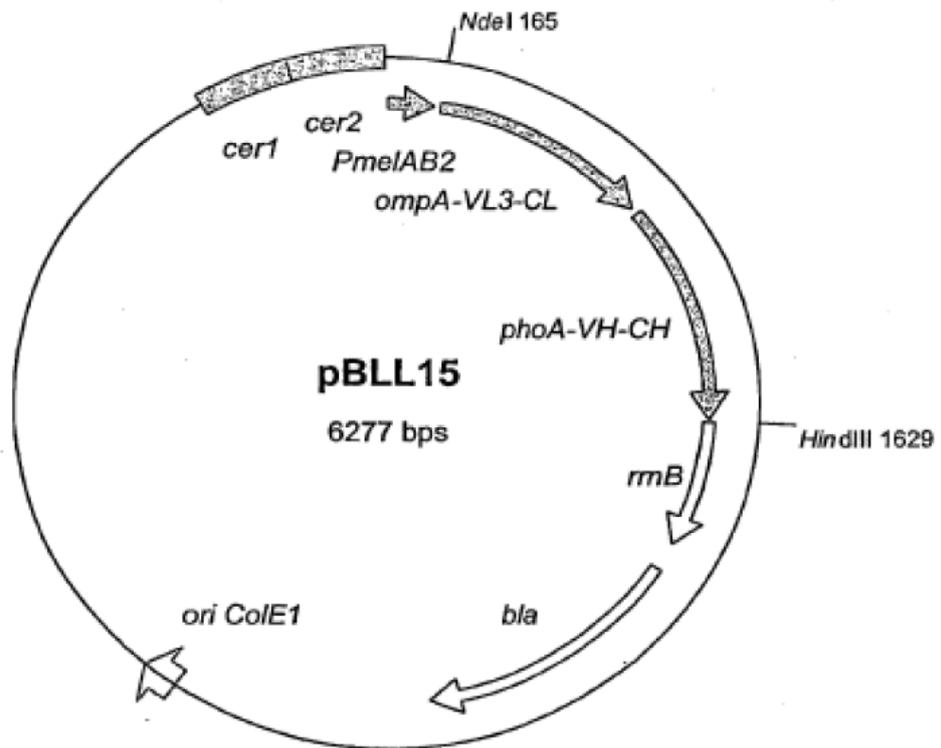


Figura 3

	[h]	0	4	6	8	11.5	22
W3110 (pBW22-Fab-H) (+)	Ramnosa	0h	4	6	8	11.5	22h
W3110 (pBW22-Fab-H) (-)							
W3110 (pBLL13) (+)	Propionato						
W3110 (pBLL13) (-)							
W3110 (pBLL15) (+)	Melibiosa						
W3110 (pBLL15) (-)							

Figura 4



Figura 5

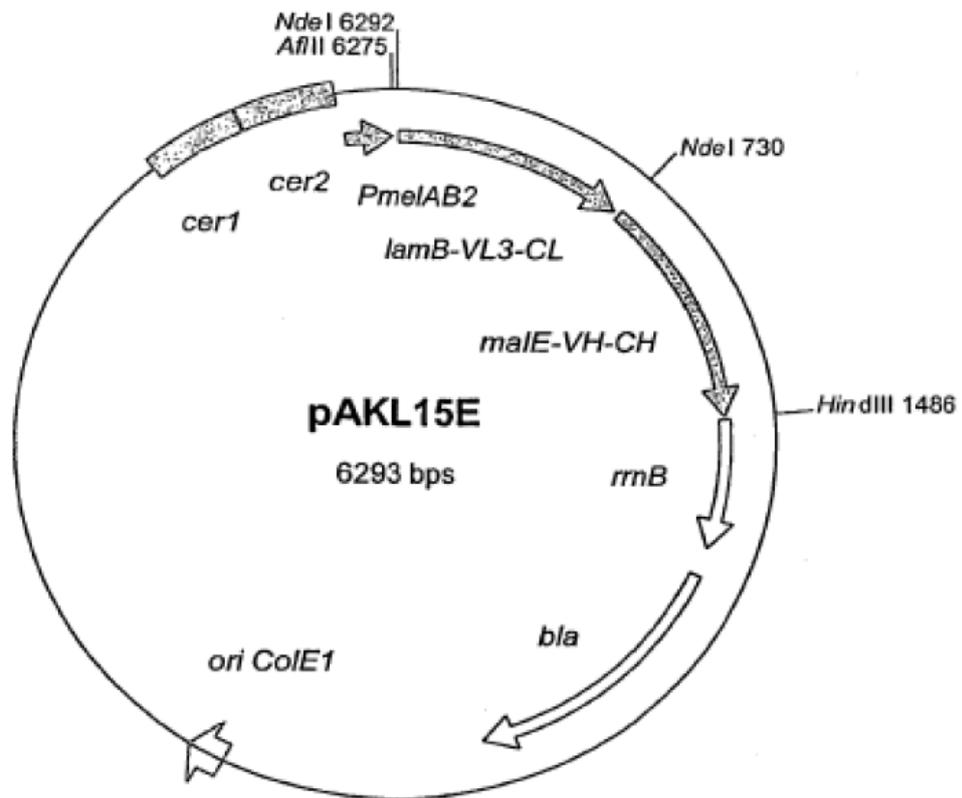


Figura 6

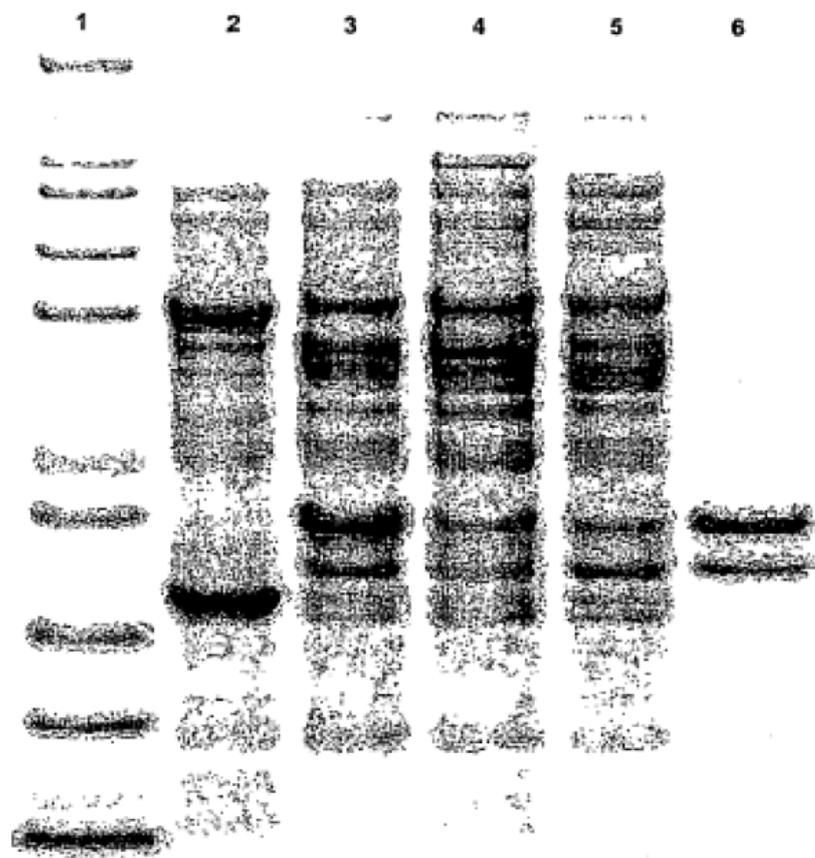


Figura 7

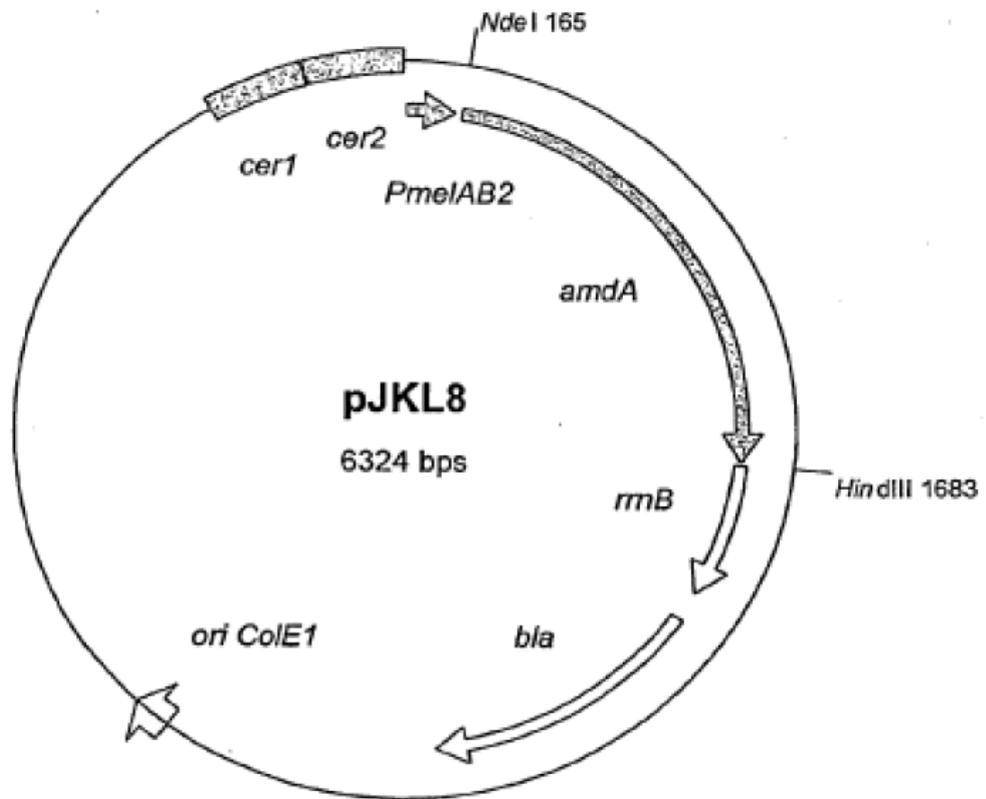


Figura 8

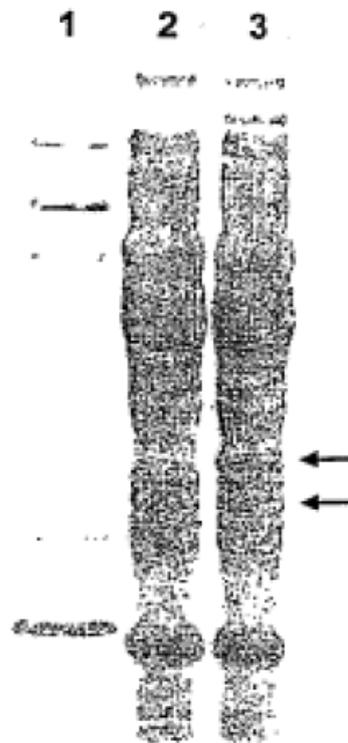


Figura 9

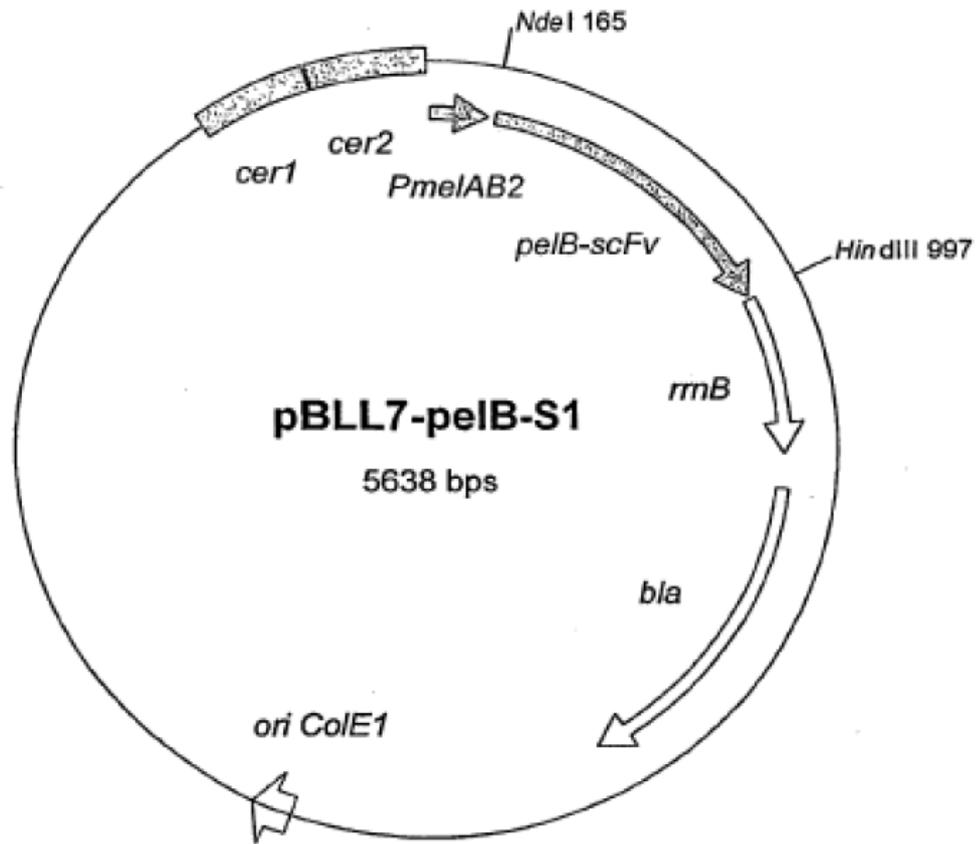


Figura 10

