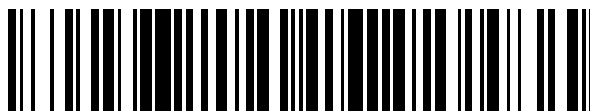


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 155**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/EP2012/002945**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12737492 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2731973**

54 Título: **Cepa hospedante bacteriana que expresa DSBC recombinante**

30 Prioridad:

13.07.2011 EP 11173880

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

14.03.2018

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

ELLIS, MARK y

HUMPHREYS, DAVID PAUL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 155 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa hospedante bacteriana que expresa DSBC recombinante

La presente invención se refiere a un cepa hospedante bacteriana recombinante, en particular *E. coli*. La invención se refiere además a un método para producir una proteína de interés en dicha célula.

5 Antecedentes de la invención

Habitualmente se emplean células bacterianas, tales como *E. coli*, para producir proteínas recombinantes que no requieren glicosilación. Existen muchas ventajas en la utilización de células bacterianas, tales como *E. coli*, para producir proteínas recombinantes, en particular debido a la naturaleza versátil de las células bacterianas como células hospedantes, que permiten la inserción de genes por medio de plásmidos. Se ha empleado *E. coli* para producir muchas proteínas recombinantes, que incluyen la insulina humana.

A pesar de las muchas ventajas del uso de células bacterianas para producir proteínas recombinantes, siguen existiendo limitaciones significativas, que incluyen un fenotipo de mala salud celular.

Por consiguiente, sigue siendo necesario proporcionar nuevas cepas bacterianas que proporcionen medios ventajosos para producir proteínas recombinantes.

15 La generación de la inmunidad humoral y mediada por células es orquestada por la interacción de células T auxiliares activadas con células presentadoras de antígenos ("antigen-presenting cells", APC) y células T efectoras. La activación de células T auxiliares no solo depende de la interacción del receptor de células T específico de antígeno ("antigen-specific T-cell receptor", TCR) con su ligando de péptido-MHC cognado, sino que también requiere la unión y activación coordinada de una serie de moléculas de adhesión a células y coestimuladoras.

20 La unión natural del receptor a CD40 es por un ligando de CD40 (CD40-L = CD154), una molécula coestimuladora crucial que se expresa sobre la superficie de células T CD4+ de una manera dependiente de la activación y restringida en el tiempo. El CD154 también se expresa, después de la activación, sobre un subconjunto de células T CD8+, basófilos, células cebadas, eosinófilos, células asesinas naturales, células B, macrófagos, células dendríticas y plaquetas. El CD40 se expresa ampliamente y de forma constitutiva sobre la superficie de muchos tipos de células, incluyendo las células B y otras células presentadoras de antígenos.

25 La señalización a través de CD40 después de la unión a CD154 inicia una cascada de acontecimientos celulares que dan como resultado la activación de células que portan el receptor CD40 y el cebado óptimo de células T CD4+. De modo más específico, la unión de CD154 a CD40 estimula la diferenciación de células B en células secretoras de anticuerpos y células B de memoria.

30 El papel crucial de CD154 para regular la función de la respuesta inmunológica humoral y mediada por células ha suscitado un gran interés por el uso de inhibidores de esta vía para la inmunomodulación terapéutica. Así, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD154 son beneficiosos en una amplia diversidad de modelos de respuesta inmunológica a otras proteínas terapéuticas o terapia génica, alérgenos, autoinmunidad y trasplantes (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.474.771 y WO 2008/118356).

35 En la técnica es necesario producir, de modo eficaz y barato, grandes cantidades de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que interfieran con la interacción de CD40 y CD154, adecuados para aplicaciones terapéuticas.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante, según se define en las reivindicaciones 1-11. La presente invención proporciona además un método, según se define en las reivindicaciones 12-15, para producir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. En la presente se describe una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende:

a) un polinucleótido recombinante que codifica DsbC; y

45 b) uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.

De modo más específico, en la presente se describe una célula bacteriana gram-negativa recombinante que se caracteriza porque la célula:

a) comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC;

b) presenta una actividad de proteína Tsp reducida comparada con una célula de tipo salvaje; y

50 c) comprende uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno,

que se une específicamente a CD154.

En una descripción adicional, la célula comprende un gen *spr* de tipo salvaje o un gen *spr* mutado, por ejemplo, capaz de suprimir el fenotipo de actividad reducida de Tsp.

5 La célula bacteriana gram-negativa según la presente invención muestra unos fenotipos de crecimiento y de producción de proteínas ventajosos.

De modo más específico, en la presente se describe una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de DsbC que comprende un marcador de histidina (His), preferiblemente en la que el polipéptido de DsbC comprende la secuencia his-his-his-his-his-his (6x histidina).

10 De modo más específico, la presente descripción proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un polinucleótido con la secuencia según SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:51.

En la presente también se describe un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.

15 De modo más específico, en la presente se describe un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de DsbC que comprende un marcador de histidina (His), preferiblemente en el que el polipéptido de DsbC comprende la secuencia his-his-his-his-his-his (6x histidina).

De modo más específico, en la presente se describe un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un polinucleótido con la secuencia según SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:51.

20 En la presente también se describe un método para producir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, que comprende:

a) cultivar una célula bacteriana gram-negativa recombinante, según se definió anteriormente, en un medio de cultivo bajo condiciones eficaces para expresar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y el polinucleótido recombinante que codifica DsbC; y

25 b) recuperar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, del periplasma de la célula bacteriana gram-negativa recombinante y/o del medio de cultivo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la construcción de un vector para su uso en la producción de una célula según una realización de la presente invención.

30 La figura 2 muestra la estructura de un compuesto que comprende un fragmento Fab' modificado unido covalentemente a través de un resto cisteína a un conector de lisilo-maleimida, en la que cada grupo amino del resto lisilo lleva unido covalentemente un resto metoxi PEG, en el que n está entre aproximadamente 420 y 450.

La figura 3 muestra el perfil de crecimiento de la cepa W3110 que expresa Fab' anti-CD154 y el perfil de crecimiento de la cepa MXE016 que expresa Fab' anti-CD154 y DsbC recombinante (W3110 ΔTsp, spr C94A). Puede observarse que la cepa MXE016 que expresa DsbC recombinante muestra un perfil de crecimiento y una tasa de crecimiento mejorados en la fase discontinua inicial, comparado con la cepa W3110.

La figura 4 muestra el rendimiento de Fab' total (g/l) del periplasma (símbolos negros) y del sobrenadante (símbolos blancos) de la cepa MXE016 que expresa DsbC recombinante, comparado con la cepa control W3110. La cepa que expresa DsbC muestra una mayor expresión periplásmica de Fab', comparada con W3110. Además, la cepa MXE016 que expresa DsbC muestra unos niveles extracelulares de Fab' equivalentes, comparado con la cepa W3110.

La figura 5 muestra los resultados de un análisis de HPLC en fase inversa de extracciones de fermentación. La cepa de tipo salvaje W3110 que expresa Fab' anti-CD154 muestra un nivel alto de cadenas ligeras kappa degradadas (fragmentos de cadena ligera [LC]). Por contraste, la cepa MXE016 (W3110 ΔTsp, spr C94A) que expresa DsbC recombinante y Fab' anti-CD154 casi no muestra fragmentos de cadena ligera debido a la ausencia de actividad Tsp proteasa.

La figura 6 muestra la recolección de Fab' anti-CD154 (g/l) de fermentaciones de la cepa W3110 y de la cepa MXE016 (W3110 ΔTsp, spr C94A) que expresa DsbC recombinante. La recolección procedente de la cepa MXE016 (W3110 ΔTsp, spr C94A) que expresa DsbC recombinante es sustancialmente mayor y muestra sustancialmente menos Fab' extracelular, lo cual resulta beneficioso porque el Fab' extracelular es un marcador del riesgo de lisis celular y el Fab extracelular no se recupera con facilidad empleando el mismo proceso que el empleado para el Fab' periplásmico.

La figura 7 muestra la viabilidad de (a) células de la cepa W3110, y (b) células de la cepa MXE016 (W3110 Δ Tsp, spr C94A) que expresan DsbC recombinante y que, en ambos casos (a) y (b), expresan Fab' anti-CD154 (g/l). Las células de la cepa MXE016 (W3110 Δ Tsp, spr C94A) que expresan DsbC recombinante muestran una mayor viabilidad.

- 5 La figura 8 muestra el rendimiento de Fab' total (g/l) de fermentaciones de cepas MXE016 que expresan Fab' anti-CD154. La barra de la derecha representa una cepa MXE016 que expresa además DsbC recombinante. La cepa MXE016 que expresa DSBC recombinante muestra un rendimiento mayor.

La figura 9 muestra las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos de una región dentro del gen ptr que ha sido mutado.

- 10 La figura 10 muestra las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos de una región dentro del gen Tsp que ha sido mutado.

La figura 11 muestra las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos de una región dentro del gen DegP que ha sido mutado.

Breve descripción de las secuencias

- 15 SEQ ID NO:1 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH1 de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:2 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH2 de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH3 de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:4 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL1 de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:5 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL2 de un anticuerpo anti-CD154.
- 20 SEQ ID NO:6 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:7 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de la cadena ligera variable (gL4) de un anticuerpo anti-CD154 (342).
 SEQ ID NO:8 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (gL4) de un anticuerpo anti-CD154 (342).
- 25 SEQ ID NO:9 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de la cadena pesada variable (gH1) de un anticuerpo anti-CD154 (342).
 SEQ ID NO:10 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (gH1) de un anticuerpo anti-CD154 (342).
- 30 SEQ ID NO:11 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos que comprende la región variable y constante de la cadena ligera (gL4) de un fragmento de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:12 muestra la secuencia de aminoácidos que comprende la región variable y constante de la cadena ligera (gL4) de un fragmento de un anticuerpo anti-CD154.
 SEQ ID NO:13 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD154 que comprende la región variable y la región CH1 con deleciones en la región de bisagra.
- 35 SEQ ID NO:14 muestra la secuencia de aminoácidos de un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD154 que comprende la región variable y la región CH1 con deleciones en la región de bisagra.
 SEQ ID NO:15 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD154 que comprende la región variable, la región CH1 y la región de bisagra.
- 40 SEQ ID NO:16 muestra la secuencia de aminoácidos de un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD154 que comprende la región variable, la región CH1 y la región de bisagra.
 SEQ ID NO:17 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de una cadena ligera kappa de un anticuerpo anti-CD154 (342) que incluye el péptido señal (aminoácidos 1-22).
 SEQ ID NO:18 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera kappa de un anticuerpo anti-CD154 (342) que incluye el péptido señal (aminoácidos 1-22).
- 45 SEQ ID NO:19 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de la cadena pesada completa de un anticuerpo IgG₄ anti-CD154 aglicosilado.

ES 2 659 155 T3

- SEQ ID NO:20 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de un anticuerpo IgG₄ anti-CD154 aglicosilado.
- SEQ ID NO:21 muestra la secuencia polinucleotídica que codifica gL4 y gH1 (sin bisagra).
- SEQ ID NO:22 muestra la secuencia polinucleotídica que codifica gL4 y gH1.
- 5 SEQ ID NO:23 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de spr de *E. coli* de tipo salvaje (n.º de registro de GenBank D86610).
- SEQ ID NO:24 muestra la secuencia de aminoácidos de spr de *E. coli* de tipo salvaje (n.º de registro de GenBank D86610).
- 10 SEQ ID NO:25 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de Tsp de *E. coli* de tipo salvaje con la secuencia señal (n.º de registro de GenBank M75634).
- SEQ ID NO:26 muestra la secuencia de aminoácidos de Tsp de *E. coli* de tipo salvaje con el péptido señal (n.º de registro de GenBank M75634).
- SEQ ID NO:27 muestra la secuencia de aminoácidos de DsbC de *E. coli* (secuencia de referencia de NCBI AP_003452).
- 15 SEQ ID NO:28 muestra la secuencia polinucleotídica para el Tsp mutado inactivado.
- SEQ ID NO:29 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de DegP de *E. coli* de tipo salvaje.
- SEQ ID NO:30 muestra la secuencia de aminoácidos de DegP de *E. coli* de tipo salvaje.
- SEQ ID NO:31 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de DegP que comprende la mutación puntual S210A y un marcador de restricción Ase I.
- 20 SEQ ID NO:32 muestra la secuencia de aminoácidos de DegP que comprende la mutación puntual S210A y un marcador de restricción Ase I.
- SEQ ID NO:33 a 36 muestran secuencias intergénicas dicistrónicas (IGS) IGS1, IGS2, IGS3 e IGS4, respectivamente.
- SEQ ID NO:37 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de OmpT de *E. coli* de tipo salvaje.
- 25 SEQ ID NO:38 muestra la secuencia de aminoácidos de OmpT de *E. coli* de tipo salvaje.
- SEQ ID NO:39 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de OmpT mutado e inactivado de *E. coli*.
- SEQ ID NO:40 muestra la secuencia de aminoácidos de OmpT mutado e inactivado *E. coli*.
- SEQ ID NO:41 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de OmpT mutado de *E. coli* que comprende las mutaciones puntuales D210A y H212A.
- 30 SEQ ID NO:42 muestra la secuencia de aminoácidos de OmpT de *E. coli* que comprende las mutaciones puntuales D210A y H212A.
- SEQ ID NO:43 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de DsbC de *E. coli* de tipo salvaje.
- SEQ ID NO:44 muestra la secuencia de aminoácidos de DsbC de *E. coli* de tipo salvaje.
- 35 SEQ ID NO:45 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de DsbC de *E. coli* que carece de un sitio de restricción EcoRI con un marcador de His.
- SEQ ID NO:46 muestra la secuencia de aminoácidos de DsbC de *E. coli* que carece de un sitio de restricción EcoRI con un marcador de His.
- SEQ ID NO:47 muestra la secuencia polinucleotídica del cebador 6283 Tsp 3'.
- SEQ ID NO:48 muestra la secuencia polinucleotídica del cebador 6283 Tsp 5'.
- 40 SEQ ID NO:49 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de prt de *E. coli* de tipo salvaje (proteasa III según el n.º de registro de GenBank X06227).
- SEQ ID NO:50 muestra la secuencia de aminoácidos de ptr de *E. coli* de tipo salvaje (proteasa III según el n.º de registro de GenBank X06227).

SEQ ID NO:51 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de DsbC de *E. coli* de tipo salvaje con un marcador de His.

SEQ ID NO:52 muestra la secuencia de aminoácidos de DsbC de *E. coli* de tipo salvaje con un marcador de His.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

5 Tsp (también conocida como Prc) es una proteasa periplásmica de 60 kDa. El primer sustrato conocido de Tsp fue la proteína-3 de unión a penicilina (PBP3) (Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*, Hara *et al.*, 4799-4813; Nagasawa *et al.*, 5890-5893), pero después se descubrió que Tsp también es capaz de romper las proteínas de la cola de fagos y, por tanto, se renombró como proteasa específica de cola ("Tail Specific Protease", Tsp). Silber, Keiler, y Sauer, 295-299, y Silber y Sauer, 237-10 440, describen una cepa de delección de *prc* (KS1000), en la que la mutación se crea reemplazando un segmento del gen *prc* por un fragmento que comprende un marcador Kan^r.

La reducción de la actividad Tsp (*prc*) es deseable para reducir la proteólisis de las proteínas de interés. La proteólisis de Fab puede manifestarse mediante la presencia de impurezas, tales como un fragmento que puede denominarse la impureza de cadena ligera.

15 Sin embargo, se descubrió que las células que carecen de la proteasa *prc* muestran un crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Hara *et al.* aislaron revertidos termorresistentes que contienen mutaciones de supresor extragénicas (*spr*) (Hara *et al.*, 63-72). *Spr* es una proteasa periplásmica unida a membranas de 18 kDa, y los sustratos de *spr* son Tsp y peptidoglicanos en la membrana externa implicados en la hidrólisis de la pared celular durante la división celular. El gen *spr* se denomina UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (SPR_ECOLI).

20 La proteína disulfuro isomerasa es una enzima que cataliza la formación y la ruptura de enlaces disulfuro entre restos cisteína dentro de las proteínas a medida que se pliegan. Se sabe que coexpresa proteínas que catalizan la formación de enlaces disulfuro para mejorar la expresión de proteínas en una célula hospedante. El documento WO 98/56930 describe un método para producir polipéptidos que contienen enlaces disulfuro heterólogos en células bacterianas, en el que una disulfuro isomerasa procariota, tal como DsbC o DsbG, se coexpresa con un polipéptido eucariota. El documento US 6.673.569 describe un operón artificial que comprende polinucleótidos que codifica cada una de DsbA, DsbB, DsbC y DsbD para su uso para producir una proteína extraña. El documento EP0786009 describe un proceso para producir un polipéptido heterólogo en bacterias, en el que la expresión del ácido nucleico que codifica DsbA o DsbC es inducida antes de la inducción de la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo.

30 DsbC es una proteína procariota que se encuentra en el periplasma de *E. coli* que cataliza la formación de enlaces disulfuro en *E. coli*. DsbC tiene una longitud de secuencia de aminoácidos de 236 (que incluye el péptido señal) y un peso molecular de 25,6 kDa (UniProt n.º P0AEG6). DsbC fue identificada por primera vez en 1994 (Missiakas, Georgopoulos, y Raina, 2013-2020; Shevchik, Condemine, y Robert-Baudouy, 2007-2012).

35 Se ha descubierto, de modo sorprendente, que la sobreexpresión de DsbC en células bacterianas gram-negativas reduce la lisis durante el cultivo de células que carecen de la proteasa Tsp. Por consiguiente, los presentes inventores han proporcionado una nueva cepa que tiene propiedades ventajosas para producir una proteína de interés.

La célula bacteriana gram-negativa que posee la anterior combinación específica de modificaciones genéticas muestra unos fenotipos de crecimiento y de producción de proteínas ventajosos.

40 En una realización, el genoma de la célula es preferiblemente isogénico con una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto por la modificación requerida para reducir la actividad de proteína de Tsp comparada con una célula de tipo salvaje.

En otra realización, la célula según la presente invención presenta una actividad de proteína de Tsp reducida comparada con una célula de tipo salvaje, y comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y una 45 proteína de *spr* alterada. En esta realización, el genoma de la célula es preferiblemente isogénico con una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto por el gen *spr* mutado y una modificación que conduce a la expresión reducida o ausente de la proteína de Tsp comparada con una célula de tipo salvaje.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se emplean en la presente de modo intercambiable, a menos que el contexto indique lo contrario. Un "péptido" pretende referirse a 20 o menos aminoácidos.

50 El término "polinucleótido" incluye un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm y sus análogos, que incluyen, pero no se limitan a ácido nucleico bloqueado (ANB, "locked nucleic acid"), ácido nucleico peptídico (ANP), ácido nucleico de morfolino, ácido nucleico de glicol (ANG) y ácido nucleico de treosa (ANT), etc., a menos que el contexto indique lo contrario.

Tal como se emplea en la presente, el término "comprende", en el contexto de la presente memoria descriptiva, debe interpretarse como "incluye".

La célula no mutada o la célula control, en el contexto de la presente invención, significa una célula del mismo tipo que la célula gram-negativa recombinante de la invención, en la que la célula no ha sido modificada para que porte el polinucleótido recombinante que codifica DsbC ni uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. Por ejemplo, una célula no mutada puede ser una célula de tipo salvaje y puede derivarse de la misma población de células hospedantes que las células de la invención antes de la modificación para introducir cualquier polinucleótido o polinucleótidos recombinantes.

Las expresiones y términos "célula", "línea celular", "cultivo celular" y "cepa" se emplean de modo intercambiable.

El término "isogénico", en el contexto de la presente invención, significa que la célula comprende la misma, o sustancialmente la misma secuencia o secuencias de ácidos nucleicos, comparada con la célula de tipo salvaje, excepto por los elementos incorporados en ella que caracterizan la invención, por ejemplo, el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y opcionalmente una modificación que conduce a la expresión reducida o ausente de la proteína de Tsp, y opcionalmente un gen spr mutado. En esta realización, la célula según la presente invención no comprende más cambios no naturales ni cambios introducidos mediante ingeniería genética en su genoma.

En la presente también se describe una célula en la que el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, se insertan en el genoma de la célula, y la célula según la presente invención puede tener sustancialmente la misma secuencia genómica comparada con la célula de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, y opcionalmente una modificación que produce como resultado la expresión reducida o ausente de la proteína de Tsp o la expresión de una proteína Tsp con actividad proteasa reducida, y opcionalmente un gen spr mutado que codifica una proteína con actividad reducida, comparada con el tipo salvaje, tomando en cuenta cualquier mutación natural que pueda producirse. En una realización, en la que el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, se insertan en el genoma de la célula, la célula según la invención puede tener exactamente la misma secuencia genómica comparada con la célula de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno.

El polinucleótido que codifica DsbC puede estar presente en un vector de expresión adecuado transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula hospedante. Cuando el polinucleótido que codifica DsbC se inserta en el genoma de la célula hospedante, la célula de la presente invención se diferencia de una célula de tipo salvaje debido al polinucleótido insertado que codifica la DsbC. En este caso, el genoma de la célula hospedante puede ser isogénico comparado con el genoma de una célula de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

Preferiblemente, el polinucleótido que codifica DsbC está en un vector de expresión en la célula, por lo cual provoca una alteración mínima en el genoma de la célula hospedante.

Dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, pueden estar contenidos dentro de un vector de expresión adecuado transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula hospedante. En la realización en que el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, se inserta en el genoma del hospedante, la célula de la presente invención se diferencia de una célula de tipo salvaje debido al polinucleótido o polinucleótidos insertados que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno. En esta realización, el genoma de la célula hospedante puede ser isogénico comparado con el genoma de una célula de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido o polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno. Preferiblemente, el polinucleótido que codifica la proteína de interés está en un vector de expresión en la célula, por lo cual provoca una alteración mínima en el genoma de la célula hospedante.

En la presente también se describe una célula, en la que el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, se insertan en el genoma del hospedante. En este caso, la célula descrita se diferencia de la célula de tipo salvaje debido al polinucleótido recombinante insertado que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, y opcionalmente una modificación que produce como resultado la expresión reducida o ausente de la proteína de Tsp o la expresión de una proteína Tsp con actividad proteasa reducida, y opcionalmente un gen spr mutado que codifica una proteína con actividad reducida, comparada con el tipo salvaje. En este caso, el genoma de la célula hospedante puede ser isogénico comparado con el genoma de una célula de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno.

En una realización preferida, el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, están presentes en

el mismo vector de expresión o en vectores de expresión diferentes en la célula, por lo cual provocan una alteración mínima en el genoma de la célula hospedante. En la presente también se describe un caso en el que el genoma de esta célula puede ser sustancialmente idéntico o exactamente idéntico al genoma de una célula de tipo salvaje.

5 En una realización se proporciona una célula de *E. coli* recombinante que presenta una actividad Tsp reducida y opcionalmente un gen spr, o uno de sus mutantes, en la que las modificaciones en la actividad Tsp y cualquier mutación en el gen spr se realizan mediante cambios en el genoma de la célula. La célula según esta realización puede transformarse con un vector, tal como un plásmido que codifica el vector de DsbC y el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. En una realización, el vector o plásmido no está integrado en el genoma de la célula.

10 La expresión "tipo salvaje", en el contexto de la presente invención, significa una cepa de células bacterianas gram-negativas tal como puede aparecer en la naturaleza o tal como puede aislarse del entorno, que no porta ningún polinucleótido recombinante ni mutaciones introducidas mediante ingeniería genética. Un ejemplo de una cepa de tipo salvaje de *E. coli* es la cepa K-12 y su cepa parental W3110. En la actualidad, la cepa K-12 de *E. coli* lleva en cultivo desde hace 90 años (Bachmann 525-57). La cepa K-12 de *E. coli* y sus cepas parentales, tales como W3110, son muy conocidas en la técnica. La cepa W3110 está disponible, por ejemplo, en the American Tissue Culture
15 Collection (ATCC) con el n.º de catálogo 27325. W3110 tiene el genotipo: F⁺, λ⁻, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1.

Los presentes inventores han proporcionado una célula bacteriana gram-negativa recombinante adecuada para expresar un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

20 Las células según la presente invención comprenden un polinucleótido recombinante que codifica DsbC. Tal como se emplea en la presente, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o se produce empleando la tecnología del ADN recombinante. El polinucleótido que codifica DsbC puede ser idéntico al polinucleótido endógeno que codifica DsbC que se encuentra en células bacterianas de tipo salvaje. Como alternativa, el polinucleótido recombinante que codifica DsbC es una versión mutada del polinucleótido de DsbC de
25 tipo salvaje que se ha alterado, por ejemplo, de tal forma que se elimina un sitio de restricción de la proteína DsbC, tal como un sitio EcoRI y/o el marcador de his. Un ejemplo de un polinucleótido de DsbC modificado para su uso en la presente invención se muestra en SEQ ID NO:45, que codifica la secuencia de DsbC marcada con his mostrada en SEQ ID NO:46.

30 DsbC se caracteriza por la presencia de un sitio activo que comprende los aminoácidos -CXXC-, en el que XX representa los aminoácidos GY. Los variantes de DsbC incluyen aquellos en los que cada X representa un aminoácido seleccionado independientemente (con la condición de que XX no represente GY). Los ejemplos de XX incluyen NY, SF, TF, MF, GF, HH, VH, SH, RF, FA, GA, MA, GI o AV.

En una realización, la célula hospedante de la invención comprende un variante de DsbC, por ejemplo, en el que el sitio activo está alterado, en tal como se describió anteriormente.

35 En una realización, el variante de DsbC tiene al menos la actividad biológica de la proteína de tipo salvaje, por ejemplo, tal como se mide en un ensayo *in vitro*.

En una realización, el variante de DsbC tiene una actividad biológica mayor que la proteína de tipo salvaje, por ejemplo, tal como se mide en un ensayo *in vitro*.

40 En una realización, el variante de DsbC presenta una alteración en el sitio activo -CXXC-, en el que XX representa NY, SF, TF, MF, GF, HH, VH, SH.

En una realización, la DsbC es de tipo salvaje.

45 Los presentes inventores han descubierto que la selección de la expresión de un polinucleótido recombinante que codifica DsbC en una célula bacteriana proporciona una célula hospedante mejorada para expresar un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. Las células proporcionadas por la presente invención tienen una salud celular y un fenotipo de crecimiento mejorados, comparado con las células bacterianas de tipo salvaje.

50 Una salud celular mejorada, tal como se emplea en la presente, pretende referirse a una o más propiedades mejoradas en comparación con células que no portan las características según la presente invención, por ejemplo, una menor propensión a la lisis celular en la fase de crecimiento o después de la inducción de la expresión de una proteína heteróloga en la célula, u otra propiedad beneficiosa, tal como conocen los expertos en la técnica.

55 Las células según la presente invención muestran un rendimiento de producción de proteínas, tales como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, mejorado, comparado con las células bacterianas de tipo salvaje. El rendimiento de proteínas mejorado puede ser la tasa de producción de proteínas y/o la duración de la producción de proteínas de la célula. El rendimiento de proteínas mejorado puede ser el rendimiento de proteínas periplásmicas y/o el rendimiento de proteínas del sobrenadante. Las células bacterianas recombinantes pueden ser capaces de

5 presentar una tasa más rápida de producción de la proteína, tal como un anticuerpo o uno de sus fragmentos, y, por tanto, puede producirse la misma cantidad de una proteína de interés en menos tiempo, comparado con una célula bacteriana no mutada. La tasa de producción más rápida de una proteína de interés puede ser especialmente significativa en el periodo inicial de crecimiento de la célula, por ejemplo, en las primeras 5, 10, 20 o 30 horas después de la inducción de la expresión de la proteína.

Las células según la presente invención preferiblemente expresan un rendimiento en el periplasma y/o el medio de aproximadamente 1,0 g/l, 1,5 g/l, 1,8 g/l, 2,0 g/l, 2,4 g/l, 2,5 g/l, 3,0 g/l, 3,5 g/l o 4,0 g/l del anticuerpo.

10 De forma ventajosa, la actividad reducida de la proteína de Tsp y/o la coexpresión de DsbC conduce a una menor generación de la impureza no deseada denominada en la presente el fragmento de cadena ligera (LC); véase, por ejemplo, la figura 5.

15 Los expertos en la técnica serán capaces de ensayar con facilidad un clon celular candidato para determinar si presenta el rendimiento deseado de una proteína de interés empleando métodos muy conocidos en la técnica, que incluyen un método de fermentación, ELISA y HPLC de proteína G. Se describen métodos de fermentación adecuados en Humphreys *et al.*, 193-202; Backlund *et al.*, 358-365. Los expertos en la técnica también serán capaces de ensayar con facilidad la proteína segregada para determinar si la proteína está correctamente plegada empleando métodos muy conocidos en la técnica, tales como HPLC de proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medición de afinidad por epítopos.

20 En la presente también se describe una célula según la presente invención que también expresa o sobreexpresa, comparada con la correspondiente célula de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, la cepa W3110 K-12 de *E. coli*, una o más proteínas adicionales como sigue:

- una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID; y/o
- una o más proteínas capaces de facilitar la secreción o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; y/o
- 25 • una o más proteínas capaces de facilitar la formación de enlaces disulfuro, tales como DsbA, DsbB, DsbD, DsbG.

Una o más de las anteriores proteínas puede integrarse en el genoma de la célula y/o insertarse en un vector de expresión.

30 En la presente también se describe una célula según la presente invención que no expresa o expresa a un nivel que es al menos 50%, 75% o 90% menor que el nivel de la correspondiente célula de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, la cepa W3110 K-12 de *E. coli*, una o más de las siguientes proteínas adicionales:

- una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID;
- 35 • una o más proteínas capaces de facilitar la secreción o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; y
- una o más proteínas capaces de facilitar la formación de enlaces disulfuro, tales como DsbA, DsbB, DsbD, DsbG.

En la presente también se describe una célula según la presente invención que también expresa o sobreexpresa una o más proteínas adicionales seleccionadas de FkpA, Skp y sus combinaciones.

40 En la presente también se describe una célula que comprende además uno o más de los siguientes genes mutados:

- a) un gen spr mutado;
- b) un gen Tsp mutado, en el que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen Tsp mutado inactivado;
- 45 c) un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad de chaperona y una actividad proteasa reducida;
- d) un gen ptr mutado, en el que el gen ptr codifica una proteína de proteasa III que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado inactivado; y
- e) un gen OmpT mutado, en el que el gen OmpT codifica una proteína OmpT que tiene una actividad proteasa reducida, por ejemplo, tal como se muestra en SEQ ID NO:42, o es un OmpT mutado inactivado, por ejemplo, tal

como se muestra en SEQ ID NO:40.

En la descripción básica, la célula bacteriana gram-negativa no porta un gen Tsp mutado inactivado, por ejemplo, no es deficiente en el Tsp cromosómico.

5 Esta última mutación tiene una importancia particular en la producción de anticuerpos y sus fragmentos que se unen específicamente a CD154, porque la actividad proteasa de Tsp puede producir la ruptura del producto de anticuerpo en las regiones de codo, generando con ello un subproducto en cantidades significativas y reduciendo el rendimiento del producto deseado.

10 Así, en la presente se describe un célula según la presente invención que comprende un gen Tsp mutado, en el que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida, o es un gen Tsp mutado inactivado, y también codifica una proteína DsbC además de un anticuerpo o un fragmento específico de CD154.

En la memoria descriptiva se describe además una célula que comprende también un gen spr mutado. La proteína spr es una proteasa periplásmica unida a membrana de *E. coli*.

15 La secuencia de aminoácidos de la proteína Spr de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:24 con la secuencia señal en el N-terminal (aminoácidos 1-26 según el n.º de registro de UniProt P0AFV4). La numeración de los aminoácidos de la secuencia de la proteína Spr en la presente invención incluye la secuencia señal. Por consiguiente, el aminoácido 1 de la proteína Spr es el primer aminoácido (Met) que se muestra en SEQ ID NO:24.

20 Además, en la presente se describe una célula que comprende un gen spr mutado, y el gen spr mutado es preferiblemente el gen spr cromosómico de la célula. El gen spr mutado codifica una proteína Spr capaz de suprimir un fenotipo desventajoso asociado con una célula que comprende un gen Tsp mutado. Las células que portan un gen Tsp mutado pueden presentar una buena tasa de crecimiento celular, pero una limitación de estas células es su tendencia a lisar, en especial a altas densidades celulares. Por consiguiente, el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado es una tendencia a lisar, en especial a altas densidades celulares.

25 Las células que portan un gen Tsp mutado muestran un crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Sin embargo, las mutaciones spr que portan las células de la presente invención, cuando se introducen en una célula que tiene actividad Tsp reducida, suprimen este fenotipo de crecimiento termosensible a baja osmolaridad, y la célula muestra una lisis reducida, en particular a una alta densidad celular. Este fenotipo de "crecimiento termosensible" de una célula puede ser medido con facilidad por los expertos en la técnica con una técnica de fermentación de alta densidad celular o de matraz de agitación. La supresión de la lisis celular resulta evidente por la mejor tasa de crecimiento y/o producción de proteínas recombinantes, en particular en el periplasma, que muestra una célula que porta un spr mutante y que tiene una actividad Tsp reducida, comparado con una célula que porta el Tsp mutante y un spr de tipo salvaje.

35 Las células según lo descrito en la presente preferiblemente comprenden un gen spr mutante que codifica una proteína spr que presenta un cambio en uno o más aminoácidos seleccionados de N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147, H157 y W174, más preferiblemente en uno o más aminoácidos seleccionados de C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147, H157 y W174. Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que presenta un cambio en uno o más aminoácidos seleccionados de N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147 y H157, más preferiblemente en uno o más aminoácidos seleccionados de C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 y H157. En este caso, la proteína spr preferiblemente no presenta ningún otro cambio de aminoácido. Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que presenta un cambio en uno o más aminoácidos seleccionados de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147, más preferiblemente en uno o más aminoácidos seleccionados de S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. En este caso, la proteína spr preferiblemente no presenta ningún otro cambio de aminoácido.

45 Los presentes inventores han identificado cambios en spr que son capaces de suprimir el fenotipo de crecimiento de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

50 Los inventores también han descubierto que, de modo sorprendente, las células que portan un gen DsbC recombinante, un gen spr mutado y que tienen una actividad de proteína Tsp reducida, comparado con una célula de tipo salvaje, muestran una mayor tasa de crecimiento celular y una mayor duración de la supervivencia de la célula, comparado con una célula que comprende un gen Tsp mutado. De modo específico, las células que portan un gen DsbC recombinante, un cambio en la proteína spr y que tienen una actividad de proteína Tsp reducida muestran una lisis celular reducida durante el cultivo, comparado con células que portan un gen Tsp mutado.

55 El cambio de uno o más de los anteriores aminoácidos de spr puede ser el resultado de cualquier mutación de sentido erróneo adecuada en uno, dos o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido. La mutación cambia el resto aminoácido a cualquier aminoácido adecuado que produzca una proteína spr mutada capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. La mutación de sentido erróneo puede cambiar el aminoácido a otro aminoácido que tenga un tamaño diferente y/o propiedades químicas diferentes, comparado con el aminoácido de tipo salvaje.

En la presente también se describe un cambio con respecto a uno, dos o tres de la tríada catalítica de los restos aminoácidos de C94, H145, and H157 (Aramini *et al.*, 9715-9717).

Por consiguiente, el gen spr mutado puede comprender:

- una mutación que afecta al aminoácido C94; o
- 5 • una mutación que afecta al aminoácido H145; o
- una mutación que afecta al aminoácido H157; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos C94 y H145; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos C94 y H157; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos H145 y H157; o
- 10 • una mutación que afecta a los aminoácidos C94, H145 y H157.

En este caso, la proteína spr preferiblemente no presenta ningún otro cambio de aminoácido.

Uno, dos o tres de C94, H145 y H157 pueden cambiarse a cualquier aminoácido adecuado que produzca una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno, dos o tres de C94, H145 y H157 pueden cambiarse a un aminoácido pequeño, tal como Gly o Ala. Por consiguiente, la

15 proteína spr puede presentar una, dos o tres de las mutaciones que producen C94A (es decir, una cisteína en la posición 94 cambia a alanina), H145A (es decir, una histidina en la posición 145 cambia a alanina) y H157A (es decir, una histidina en la posición 157 cambia a alanina). Preferiblemente, el gen spr comprende la mutación de sentido erróneo que conduce a H145A, que se ha descubierto que produce una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

20 La designación de un mutante de sustitución en la presente consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra indica el aminoácido en la proteína de tipo salvaje. El número se refiere a la posición del aminoácido en que se está realizando esa sustitución de aminoácido, y la segunda letra indica el aminoácido que se emplea para reemplazar al aminoácido de tipo salvaje.

25 En la presente también se describe una proteína spr mutante que comprende un cambio en uno o más aminoácidos seleccionados de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147, preferiblemente un cambio de uno o más aminoácidos seleccionados de S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no presenta ninguna otra mutación. Por consiguiente, el gen spr mutado puede comprender:

- una mutación que afecta al aminoácido N31; o
- 30 • una mutación que afecta al aminoácido R62; o
- una mutación que afecta al aminoácido 170; o
- una mutación que afecta al aminoácido Q73; o
- una mutación que afecta al aminoácido S95; o
- una mutación que afecta al aminoácido V98; o
- 35 • una mutación que afecta al aminoácido Q99; o
- una mutación que afecta al aminoácido R100; o
- una mutación que afecta al aminoácido L108; o
- una mutación que afecta al aminoácido Y115; o
- una mutación que afecta al aminoácido D133; o
- 40 • una mutación que afecta al aminoácido V135; o
- una mutación que afecta al aminoácido L136; o

- una mutación que afecta al aminoácido G140; o
- una mutación que afecta al aminoácido R144; o
- una mutación que afecta al aminoácido G147.

En una descripción, el gen spr mutante comprende múltiples mutaciones que afectan a los aminoácidos:

- 5
- S95 y Y115; o
 - N31, Q73, R100 y G140 ; o
 - Q73, R100 y G140; o
 - R100 y G140; o
 - Q73 y G140; o
- 10
- Q73 y R100;o
 - R62, Q99 y R144;o
 - Q99 y R144.

15 Uno o más de los aminoácidos N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147 pueden cambiarse a cualquier aminoácido adecuado que produzca una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno o más de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140 y R144 pueden cambiarse a un aminoácido pequeño, tal como Gly o Ala.

20 En la presente también se describe una proteína spr que comprende uno o más de los siguientes cambios: N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C. Preferiblemente, la proteína spr comprende uno o más de los siguientes cambios: S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D o V135G y G147C. En este caso, la proteína spr preferiblemente no presenta ningún otro cambio de aminoácido.

25 En un caso, la proteína spr solo presenta un cambio de aminoácido seleccionado de N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C, en particular C94A. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no presenta ningún otro cambio de aminoácido.

En la presente también se describe una proteína spr que presenta múltiples cambios seleccionados de:

- S95F y Y115F
 - N31Y, Q73R, R100G y G140C;
 - Q73R, R100G y G140C;
- 30
- R100G y G140C;
 - Q73R y G140C;
 - Q73R y R100G;
 - R62C, Q99P y R144C; o
 - Q99P y R144C.

35 Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que presenta un cambio de aminoácido seleccionado de C94A, D133A, H145A y H157A, en particular C94A

Otro caso descrito es un gen spr mutado que codifica una proteína spr que presenta el cambio de aminoácido W174R. En una descripción alternativa, la proteína spr no presenta el cambio de aminoácido W174R.

40 La célula según la presente invención presenta una actividad de proteína Tsp reducida comparada con una célula de tipo salvaje. La expresión "actividad de proteína Tsp reducida comparada con una célula de tipo salvaje" significa que la actividad Tsp de la célula es menor, comparada con la actividad Tsp de una célula de tipo salvaje. La célula puede modificarse mediante de cualquier medio adecuado para reducir la actividad de Tsp.

En una realización, la actividad Tsp reducida surge de la modificación del polinucleótido endógeno que codifica Tsp y/o secuencias de expresión reguladoras asociadas. La modificación puede reducir o detener la transcripción y traducción del gen Tsp, o puede proporcionar una proteína Tsp expresada con menor actividad proteasa, comparada con la proteína Tsp de tipo salvaje.

- 5 En una realización, una secuencia de expresión reguladora asociada se modifica para reducir la expresión de Tsp. Por ejemplo, el promotor para el gen Tsp puede mutarse para evitar la expresión del gen.

En una realización preferida, la célula según la presente invención porta un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida o un gen Tsp mutado inactivado. Preferiblemente, se muta el gen Tsp cromosómico.

- 10 Tal como se emplea en la presente, un "gen Tsp" significa un gen que codifica la proteasa Tsp (también conocida como Prc) que es una proteasa periplásmica capaz de actuar sobre la proteína-3 de unión a penicilina (PBP3) y las proteínas de la cola de fagos. La secuencia del gen Tsp de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:25, y la secuencia de la proteína Tsp de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:26.

- 15 La referencia al gen Tsp mutado o un gen Tsp mutado que codifica Tsp indica un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp con una actividad proteasa reducida o un gen Tsp mutado inactivado, a menos que se indique lo contrario.

La expresión "gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida", en el contexto de la presente invención, significa que el gen Tsp mutado no posee la actividad proteasa completa, comparado con el gen Tsp no mutado de tipo salvaje.

- 20 Preferiblemente, el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, o 5% o menos de la actividad proteasa de una proteína Tsp no mutada de tipo salvaje. Más preferiblemente, el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que no tiene actividad proteasa. En esta realización, la célula no es deficiente en Tsp cromosómico, es decir, la secuencia del gen Tsp no ha sido deletada ni mutada para evitar la expresión de cualquier forma de proteína Tsp.

- 25 Puede introducirse cualquier mutación adecuada en el gen Tsp para producir una proteína que tenga actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína Tsp expresada por una bacteria gram-negativa puede ser ensayada con facilidad por los expertos en la técnica mediante cualquier método adecuado en la técnica, tal como el método descrito en Keiler *et al.* (Keiler y Sauer, 28864-28868), en el que se ensaya la actividad proteasa de Tsp.

- 30 En Keiler *et al.* (*supra*) se ha indicado que Tsp presenta un sitio activo que comprende los restos S430, D441 y K455, y los restos G375, G376, E433 y T452 son importantes para mantener la estructura de Tsp. Keiler *et al.* (*supra*) indican que han descubierto que los genes Tsp mutados que conducen a los cambios de aminoácidos S430A, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A no tienen actividad proteasa detectable. También indican que el gen Tsp mutado que conduce a S430C muestra aproximadamente 5-10% de la actividad del tipo salvaje. Por consiguiente, la mutación de Tsp para producir una proteína que tenga una actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de sentido erróneo que conduzca a un cambio de uno o más de los restos S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452. Preferiblemente, la mutación de Tsp para producir una proteína que tenga una actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de sentido erróneo que afecta a uno, dos o tres de los restos del sitio activo S430, D441 y K455.

Por consiguiente, el gen Tsp mutado puede comprender:

- 40
- una mutación que afecta al aminoácido S430; o
 - una mutación que afecta al aminoácido D441; o
 - una mutación que afecta al aminoácido K455; o
 - una mutación que afecta a los aminoácidos S430 y D441; o
 - una mutación que afecta a los aminoácidos S430 y K455; o
- 45
- una mutación que afecta a los aminoácidos D441 y K455; o
 - una mutación que afecta a los aminoácidos S430, D441 y K455.

Pueden cambiarse uno o más de los restos S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452 a cualquier aminoácido adecuado que produzca una proteína que tenga actividad proteasa reducida. Los ejemplos de cambios adecuados son S430A, S430C, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A. El gen Tsp mutado puede comprender una, dos o tres mutaciones que conducen a cambios en los restos del sitio activo, por ejemplo, el gen puede comprender:

- 50

- S430A o S430C; y/o
- D441A; y/o
- K455A o K455H o K455R.

Preferiblemente, el gen Tsp presenta una mutación que conduce a S430A o S430C.

5 La expresión "gen Tsp mutado inactivado", en el contexto de la presente invención, significa que el gen Tsp comprende una o más mutaciones que evitan la expresión de la proteína Tsp codificada por el gen de tipo salvaje para proporcionar una célula deficiente en la proteína Tsp. El gen inactivado puede ser parcial o completamente transcrito pero no traducido en la proteína codificada. El gen Tsp mutado inactivado puede mutarse de cualquier forma adecuada, por ejemplo, mediante una o más mutaciones de delección, inserción, puntuales, de sentido erróneo, sin sentido y de desplazamiento de marco, para que no produzca la expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen puede inactivarse mediante la inserción de una secuencia de ADN extraña, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificadora del gen.

15 En una realización preferida, el gen Tsp no se muta mediante la inserción de una secuencia de ADN extraña, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificadora del gen. En una realización, el gen Tsp comprende una mutación en el codón de inicio del gen y/o en uno o más codones de fin colocados cadena abajo del codón de inicio del gen y cadena arriba del codón de fin del gen, evitando con ello la expresión de la proteína Tsp. La mutación en el codón de inicio puede ser una mutación de sentido erróneo de uno, dos o tres de los nucleótidos del codón de inicio. Como alternativa, o además, el codón de inicio puede mutarse mediante una mutación de desplazamiento de marco de inserción o de delección. El gen Tsp comprende dos codones ATG en el extremo 5' de la secuencia codificadora, y uno o ambos de los codones ATG pueden mutarse mediante una mutación de sentido erróneo. El gen Tsp puede mutarse en el segundo codón ATG (codón 3) a TCG, tal como se muestra en la figura 10. El gen Tsp puede comprender, como alternativa o además, uno o más codones de fin colocados cadena abajo del codón de inicio del gen y cadena arriba del codón de fin del gen. Preferiblemente, el gen Tsp mutado inactivado comprende una mutación de sentido erróneo en el codón de inicio y uno o más codones de fin insertados. En una realización preferida, el gen Tsp se muta para delecionar "T" del quinto codón, provocando con ello un desplazamiento de marco que produce codones de fin en los codones 11 y 16, tal como se muestra en la figura 10. En una realización preferida, el gen Tsp se muta para insertar un sitio de restricción Ase I para crear un tercer codón de fin dentro de marco en el codón 21, tal como se muestra en la figura 10.

30 En una realización preferida, el gen Tsp mutado inactivado tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO:25, que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT cadena arriba del codón de inicio. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia Tsp mutada inactivada de SEQ ID NO:25 se muestran en la figura 10. En una realización, el gen Tsp mutado tiene la secuencia de ADN de los nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO:25.

35 En la presente también se describe una célula que comprende un gen DegP mutado. Tal como se emplea en la presente, "DegP" significa un gen que codifica la proteína DegP (también conocida como HtrA), que tiene una función dual como chaperona y proteasa. La secuencia del gen DegP de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:29, y la secuencia de la proteína DegP no mutada se muestra en SEQ ID NO:30.

A bajas temperaturas, DegP actúa como chaperona, y a altas temperaturas DegP tiene preferencia por actuar como una proteasa.

40 En la presente también se describe una célula que comprende la mutación de DegP, en la que la mutación de DegP en la célula proporciona un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa completa.

45 La expresión "tiene actividad chaperona", en el contexto de la presente invención, significa que la proteína DegP mutada tiene la misma, o sustancialmente la misma actividad chaperona, comparada con la proteína DegP no mutada de tipo salvaje. Preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, o 95% o más de la actividad chaperona de la proteína DegP no mutada de tipo salvaje. Más preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene la misma actividad chaperona cuando se compara con la DegP de tipo salvaje.

50 La expresión "tiene actividad proteasa reducida", en el contexto de la presente invención, significa que la proteína DegP mutada no presenta la actividad proteasa completa cuando se compara con la proteína DegP no mutada de tipo salvaje. Preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, o 5% o menos de la actividad proteasa de una proteína DegP no mutada de tipo salvaje. Más preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP sin actividad proteasa. La célula no se deficiente en DegP cromosómico, es decir, la secuencias del gen DegP no han sido delecionadas ni mutadas para evitar la expresión de cualquier forma de proteína DegP.

55 Puede introducirse cualquier mutación adecuada en el gen DegP para producir una proteína que tenga actividad chaperona y una actividad proteasa reducida. La actividad proteasa y chaperona de una proteína DegP expresada

por una bacteria gram-negativa puede ser ensayada con facilidad por los expertos en la técnica mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, en el que las actividades proteasa y chaperona de DegP se ensayan sobre MalS, un sustrato natural de DegP.

5 DegP es una serina proteasa y tiene un centro activo que consiste en la tríada catalítica de los restos aminoácidos His105, Asp135 y Ser210. La mutación de DegP para producir una proteína que tenga actividad chaperona y una actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de sentido erróneo que afecta a uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210.

Por consiguiente, el gen DegP mutado puede comprender:

- una mutación que afecta al aminoácido His105; o
- 10 • una mutación que afecta al aminoácido Asp135; o
- una mutación que afecta al aminoácido Ser210; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos His105 y Asp135; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos His105 y Ser210; o
- una mutación que afecta a los aminoácidos Asp135 y Ser210; o
- 15 • una mutación que afecta a los aminoácidos His105, Asp135 y Ser210.

Uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 pueden cambiarse a cualquier aminoácido adecuado que produzca una proteína que tenga actividad chaperona y una actividad proteasa reducida. Por ejemplo, uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 pueden cambiarse a un aminoácido pequeño, tal como Gly o Ala. Otra mutación adecuada consiste en cambiar uno, dos o tres de His 105, Asp135 y Ser210 a un aminoácido que tenga propiedades opuestas, tal como cambiar Asp135 a Lys o Arg, cambiar His105 polar a un aminoácido no polar, tal como Gly, Ala, Val o Leu, y cambiar Ser210 hidrófilo pequeño a un resto hidrófobo grande o hidrófobo, tal como Val, Leu, Phe o Tyr. Preferiblemente, el gen DegP comprende la alteración S210A, tal como se muestra en la figura 11, que se ha descubierto que produce una proteína con actividad chaperona, pero no con actividad proteasa.

25 DegP presenta dos dominios PDZ, PDZ1 (restos 260-358) y PDZ2 (restos 359-448), que median en la interacción proteína-proteína. En una realización de la presente invención, el gen degP se muta para deleccionar el dominio PDZ1 y/o el dominio PDZ2. La delección de PDZ1 y PDZ2 produce la pérdida completa de actividad proteasa de la proteína DegP y una actividad chaperona menor, comparada con la proteína DegP de tipo salvaje, mientras que la delección de una u otra PDZ1 o PDZ2 produce 5% de la actividad proteasa y una actividad chaperona similar a la proteína DegP de tipo salvaje.

30 El gen DegP mutado también puede comprender un sitio de restricción no natural silencioso, tal como Ase I, para ayudar en los métodos de identificación y selección, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 11.

La secuencia preferida del gen DegP mutado que comprende la mutación puntual S210A y un sitio de marcador de restricción Ase I se proporciona en SEQ ID NO:31, y la secuencia de proteína codificada se muestra en SEQ ID NO:27. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia de DegP mutada de SEQ ID NO:32 se muestran en la figura 11.

40 En otras descripciones de la presente, la célula comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y una actividad proteasa reducida, y una o más de las células proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un mayor rendimiento de proteínas correctamente plegadas procedentes de la célula, con relación a las células mutadas en las que el gen DegP ha sido mutado para inactivar DegP evitando la expresión de DegP, tales como células deficientes en DegP cromosómico. En una célula que comprende un gen DegP mutado inactivado que evita la expresión de DegP, la actividad chaperona de DegP se pierde completamente, mientras que en la célula según la presente descripción, la actividad chaperona de DegP se mantiene al mismo tiempo que se pierde la actividad proteasa completa. En estas realizaciones, una o más células según la presente descripción presentan una actividad proteasa menor para evitar la proteólisis de la proteína, al mismo tiempo que

45 mantienen la actividad chaperona para permitir el plegamiento correcto y el transporte de la proteína en la célula hospedante.

En la presente también se describe una célula bacteriana gram-negativa según las anteriores descripciones que no porta un gen OmpT mutado inactivado, tal como una célula que es deficiente en OmpT cromosómico de SEQ ID NO:39.

50 En la presente también se describe una célula bacteriana gram-negativa según se describe en los párrafos anteriores, que no porta un gen DegP mutado inactivado, tal como una célula que es deficiente en degP cromosómico. En la presente también se describe una célula bacteriana gram-negativa según los párrafos

anteriores, que no porta un gen DegP mutado.

En la presente también se describe una célula bacteriana gram-negativa según los párrafos anteriores, que no porta un gen ptr mutado inactivado, tal como una célula que es deficiente en ptr cromosómico.

5 En la presente también se describe una célula bacteriana gram-negativa según los párrafos anteriores, que no porta un gen spr mutado.

Puede emplearse cualquier bacteria gram-negativa adecuada como célula parental para producir la célula recombinante de la presente invención. Las bacterias gram-negativas adecuadas incluyen *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *E. coli*. Preferiblemente, la célula parental es *E. coli*. Puede emplearse cualquier cepa adecuada de *E. coli* en la presente invención, pero preferiblemente se utiliza una cepa W3110 de tipo salvaje, tal como K-12 W3110.

10

Un inconveniente asociado con las cepas previamente creadas y empleadas para expresar proteínas recombinantes implica el uso de mutaciones de genes implicados en el metabolismo celular y la replicación del ADN, tales como, por ejemplo, *phoA*, *fhuA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* y *pro* en cepas de *E. coli*. Estas mutaciones pueden tener efectos perjudiciales en la célula hospedante, que incluyen efectos sobre el crecimiento celular, la estabilidad, la infiltración periplásmica, el rendimiento de expresión de la proteína recombinante y la toxicidad. Las cepas que poseen una o más de estas mutaciones genómicas, en particular las cepas que poseen un gran número de estas mutaciones, pueden mostrar una falta de aptitud que reduce la tasa de crecimiento bacteriano a un nivel que no es adecuado para la producción industrial de proteínas. Además, cualquiera de las anteriores mutaciones genómicas puede afectar a otros genes en *cis* y/o en *trans* de maneras impredecibles y perjudiciales, alterando con ello el fenotipo, la aptitud y el perfil de proteínas de la cepa. Además, el uso de células muy mutadas no es adecuado, en general, para producir proteínas recombinantes para un uso comercial, en particular productos terapéuticos, porque dichas cepas, en general, presentan unas vías metabólicas defectuosas y, por tanto, pueden tener un crecimiento bajo o nulo en medios mínimos o químicamente definidos.

15

20

25 En una realización preferida, las células portan solo las mutaciones mínimas para introducir el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, y una mutación que produce como resultado una actividad Tsp proteasa reducida y uno de sus spr mutantes.

30 En una realización, en la que el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, se insertan en el genoma de la célula, solo se realizan mutaciones mínimas en el genoma de la célula para introducir el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y/o el anticuerpo. En otra realización, en la que el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo están presentes en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión diferentes, el genoma es preferiblemente isogénico con el genoma de una célula de tipo salvaje.

35 En la presente se describen además células que no portan ninguna otra mutación que pueda tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento y/o la capacidad de una célula para expresar una proteína de interés. Por consiguiente, una o más de las células hospedantes recombinantes de la presente invención pueden mostrar una mayor expresión de proteínas y/o unas mejores características de crecimiento, comparadas con células que comprende mutaciones introducidas por ingeniería genética en la secuencia genómica. Las células proporcionadas por la presente invención también son más adecuadas para su uso para producir proteínas terapéuticas, comparadas con células que comprenden alteraciones en el genoma celular.

40

45 En una realización preferida, la célula es isogénica con una célula de *E. coli* de tipo salvaje, excepto por el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y una mutación que produce como resultado una actividad Tsp proteasa reducida y uno de sus genes spr mutantes.

En una realización se proporciona una célula isogénica con una cepa W3110 de *E. coli*, excepto que presenta una actividad Tsp reducida y un spr mutante, para su uso con un plásmido adecuado para expresar DsbC y un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.

50 En la presente también se describe una célula isogénica con una cepa W3110 de *E. coli*, excepto por el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.

La célula proporcionada por la presente invención comprende uno o más polinucleótidos que codifican un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo con especificidad por CD 154.

55 Tal como se emplea en la presente, "una célula que comprende" significa que la entidad referida está integrada en el genoma de la célula o que la célula contiene un vector, tal como un plásmido, que contiene la entidad y en general la expresa.

- 5 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo multivalente, multiespecífico, humanizado, totalmente humano o quimérico. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede proceder de cualquier especie, pero preferiblemente se deriva de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano o un fragmento humanizado. El fragmento de anticuerpo puede derivarse de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina y puede obtenerse a partir de cualquier especie que incluye, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Las partes del fragmento de anticuerpo pueden obtenerse de más de una especie, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes proceden de una especie y las regiones variables de otra especie.
- 10 El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ o Fv; un monómero o dímero de cadena ligera o de cadena pesada; así como un diacuerpo; triacuerpo; tetracuerpo; minicuerpo; anticuerpo de dominio o anticuerpo monocatenario, por ejemplo, un Fv monocatenario en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos por un conector peptídico, Fab-Fv, o un anticuerpo de especificidad dual, tal como un Fab-dAb, según se describe en el documento WO 2009/040562. De modo similar, las regiones variables de cadena pesada y ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos según sea apropiado. Los fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica (Holliger y Hudson, 1126-1136).
- 15 El anticuerpo que se une específicamente a CD154 es preferiblemente el anticuerpo 342 descrito en el documento WO 2008/118356 o comprende las CDR o regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 342 descrito en el documento WO 2008/118356. El fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 preferiblemente se deriva del anticuerpo 342 descrito en el documento WO 2008/118356 y/o comprende las CDR o regiones variables de cadena pesada y ligera de dicho anticuerpo.
- 20 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable comprende tres CDR, en las que las CDR se seleccionan de SEQ ID NO:1 para CDRH1, SEQ ID NO:2 para CDRH2 y SEQ ID NO:3 para CDRH3.
- 25 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable comprende tres CDR, en las que las CDR se seleccionan de SEQ ID NO:4 para CDRL1, SEQ ID NO:5 para CDRL2 y SEQ ID NO:6 para CDRL3.
- En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 para CDRH1, la secuencia de SEQ ID NO:2 para CDRH2 y la secuencia de SEQ ID NO:3 para CDRH3.
- 30 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4 para CDRL1, la secuencia de SEQ ID NO:5 para CDRL2 y la secuencia de SEQ ID NO:6 para CDRL3.
- 35 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD154 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 para CDRH1, la secuencia de SEQ ID NO:2 para CDRH2 y la secuencia de SEQ ID NO:3 para CDRH3, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4 para CDRL1, la secuencia de SEQ ID NO:5 para CDRL2 y la secuencia de SEQ ID NO:6 para CDRL3.
- El anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo injertada con CDR y generalmente el dominio variable comprende regiones de marco aceptoras humanas y CDR donadoras no humanas.
- 40 Preferiblemente, el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO:7) y el dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO:9).
- 45 Preferiblemente, el anticuerpo es un fragmento Fab. Preferiblemente, el fragmento Fab presenta una cadena pesada que comprende o que consiste en la secuencia indicada como SEQ ID NO:14, y una cadena ligera que comprende o que consiste en la secuencia indicada como SEQ ID NO:12. Las secuencias de aminoácidos que aparecen en SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:12 son preferiblemente codificadas por las secuencias de nucleótidos que aparecen en SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:11, respectivamente.
- 50 Como alternativa, se prefiere que el fragmento de anticuerpo sea un fragmento Fab modificado, en el que la modificación es la adición en el extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o indicadora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos cisteína a los cuales puede unirse la molécula efectora o indicadora, tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 98/25971).
- La célula según la presente invención comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo.
- En una realización preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena ligera y comprende la secuencia mostrada en la presente.

La secuencia de ADN puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por medio de procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquiera de sus combinaciones.

Los dominios de región constante del anticuerpo, si están presentes, pueden seleccionarse tomando en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que puedan ser necesarias.

5 Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, pueden emplearse los dominios de región constante de IgG humana, en especial de los isotipos IgG₁ e IgG₃ cuando esté previsto que la molécula anticuerpo se dirija a usos terapéuticos y sean necesarias las funciones efectoras del anticuerpo. Como alternativa, pueden emplearse los isotipos IgG₂ e IgG₄ cuando esté previsto que la molécula anticuerpo se dirija a objetivos terapéuticos y no sean necesarias las funciones efectoras del anticuerpo,
10 por ejemplo, simplemente para bloquear la actividad CD154.

El anticuerpo puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunológicos, trastornos fibróticos y cánceres.

15 Las expresiones "enfermedad inflamatoria" o "trastorno autoinmunitario" y "enfermedad o trastorno inmunológico" incluyen la artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, artritis juvenil, enfermedad de Still, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, vasculitis, que incluye vasculitis asociada a ANCA y granulomatosis de Wegener, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, polimialgia reumática, síndrome de Guillain-Barre, síndrome antifosfolípidos, trombocitopenia idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, dermatomiositis, pénfigoide buloso, púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis,
20 enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LES (lupus eritematoso sistémico), enfermedad celíaca, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus de tipo I, trasplantes y enfermedad del injerto frente al receptor.

La expresión "trastorno fibrótico", tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno que se caracteriza por la formación o el desarrollo de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o un tejido, con frecuencia como un proceso reparador o reactivo. Un trastorno fibrótico puede afectar a órganos individuales, tales como los pulmones (por ejemplo, sin limitación, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial), el hígado, el intestino, el riñón, el corazón o la piel, o afectar a múltiples órganos, por ejemplo y sin limitación, en la esclerosis sistémica. La expresión trastornos fibróticos también se relaciona con la formación de cicatrices en la piel. Las cicatrices de la piel incluyen, pero no se limitan a cicatrices queloides, cicatrices de contractura que aparecen, por
30 ejemplo y sin limitación, después de quemaduras de la piel, cicatrices hipertróficas y cicatrices del acné.

La célula hospedante de la invención también puede comprender otro polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés adicionales.

La célula bacteriana gram-negativa recombinante según la presente invención puede producirse mediante cualquier medio adecuado.

35 Los expertos en la técnica conocen técnicas adecuadas que pueden emplearse para insertar el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo. El polinucleótido recombinante que codifica DsbC y/o el polinucleótido que codifica el anticuerpo pueden integrarse en el genoma de la célula empleando un vector adecuado, tal como pKO3 descrito en Link *et al.* (Link, Phillips, y Church, 6228-6237).

40 Como alternativa o además, el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y/o el polinucleótido que codifica el anticuerpo pueden no estar integrados en un módulo de expresión recombinante. En una realización, se emplea un módulo de expresión en la presente invención para portar el polinucleótido que codifica DsbC y/o el polinucleótido que codifica el anticuerpo que generalmente comprende una secuencia codificadora de proteína que codifica DsbC, una o más secuencias codificadoras de proteínas que codifican el anticuerpo y una o más secuencias reguladoras de la expresión reguladoras. Dichas una o más secuencias reguladoras de la expresión pueden incluir un promotor.
45 Dichas una o más secuencias reguladoras de la expresión pueden incluir además una región 3' no traducida, tal como una secuencia de terminación. Los promotores adecuados se analizan con más detalle a continuación.

En una realización, el gen que codifica DsbC y/o el anticuerpo, o uno de sus fragmentos, se integran en el genoma de la célula hospedante para crear una línea celular estable.

50 En una realización, la célula según la presente invención comprende uno o más vectores de expresión, tales como un plásmido. El vector comprende preferiblemente uno o más de los módulos de expresión definidos anteriormente. La célula hospedante preferiblemente comprende un vector de expresión que comprende un ADN que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, el vector de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera y una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada del anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.
55

En una realización preferida, el vector de expresión es un vector de expresión de *E. coli*.

En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo y el polinucleótido que codifica DsbC se insertan en vectores de expresión distintos.

5 Para la producción de productos que comprenden cadenas pesadas y ligeras, la línea celular puede transformarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, puede emplearse un solo vector, y el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Como alternativa, la secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo y el polinucleótido que codifica DsbC se insertan en un solo vector. Preferiblemente, el vector comprende las secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada del anticuerpo.

10 La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. El vector de expresión es un vector multicistrónico que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica DsbC y la secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo.

15 El vector multicistrónico puede ser producido por medio de un método de clonación ventajoso que permita la clonación secuencial repetida de secuencias polinucleotídicas en un vector. El método emplea extremos cohesivos compatibles de un par de sitios de restricción, tales como los extremos "AT" de los sitios de restricción *Ase I* y *Nde I*. Un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora y que tiene extremos cohesivos compatibles, tal como un fragmento *Ase I-Nde I*, puede clonarse en un sitio de restricción en el vector, tal como *Nde I*. La inserción de la secuencia polinucleotídica destruye el sitio de restricción 5', pero crea un nuevo sitio de restricción 3', tal como *Nde I*, que entonces puede emplearse para insertar otra secuencia polinucleotídica que comprende extremos cohesivos compatibles. El proceso entonces puede repetirse para insertar más secuencias. Cada secuencia polinucleotídica insertada en el vector comprende la secuencia no codificadora 3' con respecto al codón de fin, que puede comprender un sitio *Ssp I* para la selección, una secuencia de unión a ribosomas de Shine Dalgarno, un espaciador rico en A y un sitio *Nde I* que codifica un codón de inicio.

25 En la figura 1 se muestra una representación en forma de diagrama de la creación de un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera de un anticuerpo (LC), una cadena pesada de un anticuerpo (HC), una secuencia polinucleotídica de DsbC y otra secuencia polinucleotídica.

La célula según la presente invención comprende preferiblemente un vector de expresión tal como se definió anteriormente.

30 En la presente también se describe una célula, en la que la célula también expresa una o más proteínas adicionales como sigue:

- una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIB; y/o
- 35 • una o más proteínas capaces de facilitar la secreción o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; y/o
- una o más proteínas capaces de facilitar la formación de enlaces disulfuro, tales como DsbA, DsbB, DsbD, DsbG;

40 y dichas una o más proteínas adicionales pueden expresarse a partir de dichos uno o más polinucleótidos insertados en el mismo vector que el polinucleótido que codifica DsbC y/o dichos uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154. Como alternativa, dichos uno o más polinucleótidos pueden insertarse en vectores distintos.

45 El vector de expresión puede producirse insertando uno o más módulos de expresión, tal como se definió anteriormente, en un vector adecuado. Como alternativa, las secuencias de expresión reguladoras para dirigir la expresión de la secuencia polinucleotídica pueden estar contenidas en el vector de expresión y, por tanto, solo puede ser necesaria la región codificadora del polinucleótido para completar el vector de expresión.

50 El polinucleótido que codifica DsbC y/o el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, se inserta de modo adecuado en un vector replicable, generalmente un vector de expresión de replicación autónoma, para la expresión en la célula bajo el control de un promotor adecuado para la célula. En la técnica se conocen muchos vectores para este fin, y la selección del vector apropiado puede depender del tamaño del ácido nucleico y del tipo de célula concreta.

Los ejemplos de vectores de expresión que pueden emplearse para transformar la célula hospedante con un polinucleótido según la invención incluyen:

- un plásmido, tal como pBR322 o pACYC184 y/o

- un vector vírico, tal como un fago bacteriano,
- un elemento genético transponible, tal como un transposón.

5 Estos vectores de expresión habitualmente comprenden un origen de la replicación del ADN del plásmido, un marcador seleccionable con antibiótico, un promotor y un terminador transcripcional separados por un sitio de multiclonación (módulo de expresión) y una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión a ribosomas.

10 Los promotores empleados en la presente invención pueden unirse al polinucleótido pertinente directamente o, como alternativa, pueden localizarse en una posición apropiada, por ejemplo, en un vector, de modo que cuando el polipéptido pertinente se inserte, el promotor pertinente pueda actuar sobre él. En una realización, el promotor se localiza antes de la porción codificadora del polinucleótido sobre el cual actúa, por ejemplo, un promotor pertinente antes de cada porción codificadora del polinucleótido. "Antes", tal como se emplea en la presente, pretende insinuar que el promotor se localiza en el extremo 5' con relación a la porción codificadora del polinucleótido.

Los promotores pueden ser endógenos o exógenos a las células hospedantes. Los promotores adecuados incluyen lac, tac, trp, phoA, lpp, Arab, tet y T7.

15 Uno o más de los promotores empleados pueden ser promotores inducibles. En la realización en la que el polinucleótido que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo se insertan en un vector, las secuencias de nucleótidos que codifican DsbC y el anticuerpo pueden estar bajo el control de un único promotor o de promotores distintos. En la realización en la que las secuencias de nucleótidos que codifican DsbC y el anticuerpo están bajo el control de promotores distintos, los promotores pueden ser independientemente promotores inducibles.

20 Los promotores para su uso en sistemas bacterianos en general también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operablemente al ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor puede retirarse del ADN fuente bacteriano mediante una digestión con enzimas de restricción e insertarse en el vector que contiene el ADN deseado.

25 El vector de expresión preferiblemente comprende además un mensaje dicistrónico para producir el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, tal como se describe en los documentos WO 03/048208 o WO 2007/039714. Preferiblemente, el cistrón cadena arriba contienen el ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón cadena abajo que contiene el ADN que codifica la correspondiente cadena pesada, y la secuencia intergénica dicistrónica ("intergenic sequence", IGS) preferiblemente comprende una secuencia seleccionada de IGS1 (SEQ ID NO:33), IGS2 (SEQ ID NO:34), IGS3 (SEQ ID NO:35) e IGS4 (SEQ ID NO:36).

30 Un vector de expresión preferible comprende un mensaje tricistrónico para producir la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo, o de uno de sus fragmentos de unión al antígeno, tal como se describió anteriormente, y un mensaje para producir la DsbC recombinante, que preferiblemente comprende un marcador de his.

Los terminadores pueden ser endógenos o exógenos a las células hospedantes. Un terminador adecuado es rrnB.

35 Pueden encontrarse otros reguladores transcripcionales adecuados, que incluyen promotores y terminadores, y métodos de transporte dirigido de proteínas en Makrides *et al.*, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad (Makrides, 512-538).

40 El polinucleótido de DsbC insertado en el vector de expresión preferiblemente comprende el ácido nucleico que codifica la secuencia señal de DsbC y la secuencia codificadora de DsbC. La proteína DsbC también puede dirigirse al periplasma por fusión genética con otros péptidos señal, por ejemplo, los de las proteínas: OmpA, MalB, PelB, PhoA, PhoS, LppA, DsbA. El vector preferiblemente contiene una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedantes seleccionados, preferiblemente que se replique independientemente del cromosoma del hospedante. Estas secuencias son muy conocidas para una diversidad de bacterias.

45 En una realización, la DsbC y/o la proteína de interés comprende un marcador de histidina en el N-terminal y/o C-terminal.

La molécula de anticuerpo puede segregarse de la célula o dirigirse al periplasma por medio de secuencias señal adecuadas. Como alternativa, las moléculas de anticuerpos pueden acumularse dentro del citoplasma de la célula. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se dirige al periplasma.

50 El polinucleótido que codifica el anticuerpo puede expresarse como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que presente un sitio de corte específico en el N-terminal del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una secuencia que sea reconocida y procesada por la célula hospedante. Para células hospedantes procariontas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del polipéptido nativo o eucariota, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procarionta. Las secuencias señal adecuadas incluyen OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA y DsbC. En una realización en la que la célula

comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada del anticuerpo y un polinucleótido que codifica una cadena ligera del anticuerpo, cada polinucleótido puede comprender una secuencia señal, tal como OmpA.

5 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes listados anteriormente emplea técnicas de acoplamiento convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se cortan, se ajustan y se vuelven a acoplar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Los expertos en la técnica conocen los métodos generales por los cuales los vectores pueden construirse, así como los métodos de transfección y los métodos de cultivo.

10 Pueden usarse técnicas convencionales de la biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican el anticuerpo. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o en parte empleando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden emplearse las técnicas de mutagénesis específica dirigida a sitio y de reacción de cadena con polimerasa (PCR) según sea apropiado.

15 Las realizaciones de la invención descritas en la presente con referencia al polinucleótido se aplican igualmente a realizaciones alternativas de la invención, por ejemplo, vectores, módulos de expresión y/o células hospedantes que comprenden los componentes empleados en la presente, hasta el punto en que el aspecto pertinente pueda aplicarse a estos.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, que comprende:

20 cultivar una célula bacteriana gram-negativa recombinante, según se definió anteriormente, en un medio de cultivo bajo condiciones eficaces para expresar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y el polinucleótido recombinante que codifica DsbC; y

recuperar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, del periplasma de la célula bacteriana gram-negativa recombinante y/o del medio de cultivo.

La célula bacteriana gram-negativa y el anticuerpo preferiblemente empleados en el método de la presente invención se describieron con detalle anteriormente.

25 El polinucleótido recombinante que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, pueden incorporarse en la célula hospedante empleando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Tal como se analizó anteriormente, en general, el polinucleótido que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo se incorporan como parte del mismo vector de expresión o de vectores de expresión diferentes, que son transformados en la célula.

30 El polinucleótido que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, pueden transformarse en una célula empleando técnicas convencionales, por ejemplo, empleando cloruro de rubidio, PEG o electroporación.

35 El método según la presente invención también puede emplear un sistema de selección para facilitar la selección de células estables que han sido transformados con éxito con el polinucleótido que codifica la proteína de interés. El sistema de selección generalmente emplea la cotransformación de un polinucleótido que codifica un marcador de selección. En una realización, cada polinucleótido transformado en la célula comprende además un polinucleótido que codifica uno o más marcadores de selección. Por consiguiente, la transformación de los polinucleótidos que codifican DsbC y el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y dichos uno o más polinucleótidos que codifican el marcador se produce conjuntamente, y el sistema de selección puede emplearse para seleccionar las células que producen las proteínas deseadas.

40 Las células capaces de expresar uno o más marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo ciertas condiciones impuestas de modo artificial, por ejemplo, la adición de una toxina o un antibiótico, debido a las propiedades otorgadas por el polipéptido/gen o componente polipeptídico del sistema de selección incorporado en ellas (por ejemplo, resistencia a antibióticos). Las células que no pueden expresar dichos uno o más marcadores no son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas de modo artificial. Las condiciones impuestas de modo artificial pueden seleccionarse para que sean más o menos vigorosas, según sea necesario.

45 En la presente invención puede emplearse cualquier sistema de selección adecuado. Generalmente, el sistema de selección puede basarse en la inclusión en el vector de uno o más genes que proporcionan resistencia a un antibiótico conocido, por ejemplo, un gen de resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina o ampicilina. Las células que crecen en presencia de un antibiótico pertinente pueden seleccionarse, puesto que expresan tanto el gen que confiere resistencia al antibiótico como la proteína deseada.

50 En la presente invención puede emplearse un sistema de expresión inducible o un promotor constitutivo para expresar el anticuerpo y/o la DsbC. Los sistemas de expresión inducible y los promotores constitutivos adecuados son muy conocidos en la técnica.

En una realización en la que el polinucleótido que codifica DsbC y el polinucleótido que codifica el anticuerpo están bajo el control del mismo promotor inducible o de distintos promotores inducibles, la expresión del polinucleótido o polinucleótidos que codifican el anticuerpo y el polinucleótido recombinante que codifica DsbC es inducida por la adición de un inductor al medio de cultivo.

- 5 Puede emplearse cualquier medio adecuado para cultivar la célula transformada. El medio puede adaptarse para un sistema de selección específico, por ejemplo, el medio puede comprender un antibiótico, para permitir crecer en el medio solo a las células que han sido transformadas con éxito.

Las células obtenidas del medio pueden someterse a una posterior selección y/o purificación según sea necesario. El método puede comprender además una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés, según sea necesario.

10 El anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, puede recuperarse y purificarse de la cepa, incluyendo desde el citoplasma, el periplasma o el sobrenadante. Los métodos adecuados incluyen el fraccionamiento en columnas de inmutofinidad o de intercambio iónico; la precipitación con etanol; una HPLC en fase inversa; una cromatografía de interacción hidrófoba; una cromatografía en sílice; una cromatografía en una resina de intercambio iónico, tal como S-SEPHAROSE y DEAE; un cromatofenofue; una precipitación con sulfato de amonio; y una filtración en gel.

15 En la presente se describe también un método que comprende además separar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, de DsbC.

20 Los anticuerpos, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, pueden separarse de modo adecuado del medio de cultivo y/o de un extracto de citoplasma y/o de un extracto de periplasma mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de proteína G, cromatografía de proteína L, resinas de modo mixto tíoofilicas, marcadores de His, marcadores FLAG, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad, fraccionamiento/precipitación en sulfato de amonio, etanol o PEG, membranas de intercambio iónico, cromatografía de adsorción de lecho expandido (EBA) o cromatografía de lecho móvil simulado.

25 El método también puede incluir otra etapa de medir la cantidad de expresión de la proteína de interés y seleccionar las células que presentan unos niveles de expresión altos de la proteína de interés.

Una o más de las etapas del método descrito en la presente pueden realizarse en combinación en un recipiente adecuado, tal como un biorreactor.

30 Después de la expresión, el anticuerpo puede procesarse aún más, por ejemplo, mediante conjugación con otra entidad, tal como una molécula efectora. Por consiguiente, el método según la presente invención puede comprender una etapa adicional de unir una molécula efectora al anticuerpo.

35 La expresión molécula efectora, tal como se emplea en la presente, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y sus fragmentos, por ejemplo, ricina y sus fragmentos), proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros naturales o sintéticos, ácidos nucleicos y sus fragmentos, por ejemplo, ADN, ARN y sus fragmentos, radionúclidos, en particular radio-yodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR. La molécula efectora puede unirse al anticuerpo, o a uno de sus fragmentos, mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede modificarse para unir al menos una molécula efectora, tal como se describe en los documentos WO 2005/003171 o WO 2005/003170. Los documentos WO 2005/003171 o WO 2005/003170 también describen moléculas efectoras adecuadas.

45 El anticuerpo puede tener un macrociclo para quelar un átomo de metal pesado o una toxina, tal como ricina, unidos a él mediante una estructura de puente covalente. Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de la tecnología del ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (CH2, CH3 y dominios bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa han sido reemplazados por una proteína de inmunoglobulina no funcional, o esta ha sido unida a través de un enlace peptídico, tal como una enzima o una molécula de toxina. En la realización en la que el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que presenta, en el extremo C-terminal de su cadena pesada, uno o más aminoácidos que permiten la unión de una molécula efectora o indicadora, los aminoácidos adicionales preferiblemente forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos restos cisteína a los cuales puede unirse la molécula efectora o indicadora.

50 Un grupo efector preferido es una molécula de polímero que puede unirse al fragmento Fab modificado para aumentar su semivida *in vivo*.

55 En general, la molécula de polímero puede ser un polímero sintético o natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un

polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o heteropolisacárido.

Los sustituyentes opcionales concretos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o sus derivados, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol, o sus derivados. Los polímeros naturales concretos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o sus derivados. Los "derivados", tal como se emplea en la presente, incluyen los derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos con tiol selectivos, tales como maleimidas. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo, en algunos casos, formará parte del producto como el grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 Da a 40000 Da, y más preferiblemente de 25000 Da a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso previsto del producto. Así, por ejemplo, cuando el producto está previsto para que abandone la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de una inflamación, puede resultar ventajoso emplear un polímero de peso molecular bajo, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso emplear un polímero con un peso molecular más alto, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialqueno, tal como polietilenglicol, o, en especial, un metoxipolietilenglicol, o uno de sus derivados, y en especial con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 25000 Da a aproximadamente 40000 Da.

Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unida covalentemente al átomo de azufre de un resto cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será, en general, un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener unida una o más moléculas efectoras o indicadoras. Las moléculas efectoras o indicadoras pueden estar unidas al fragmento de anticuerpo a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o cadena lateral de un aminoácido disponible localizado en el fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Una o más moléculas efectoras o indicadoras pueden unirse a un aminoácido en el extremo C-terminal o hacia el extremo C-terminal de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo.

Puede emplearse un polímero activado como material de partida para la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros, tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo al tiol, tal como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Estos materiales de partida pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, en Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE. UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado empleando procedimientos químicos convencionales.

Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o indicadora, este puede prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante o químicos convencionales, en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora o indicadora antes o después de la reacción con el polímero activado, según sea adecuado. Los procedimientos químicos concretos incluyen, por ejemplo, los descritos en el documento WO 93/62331 y WO 92/22583. Como alternativa, cuando la molécula efectora o indicadora es una proteína o un polipéptido, el enlace puede lograrse empleando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP-A-0392745.

Preferiblemente, el fragmento Fab modificado proporcionado por el método de la presente invención está PEGilado (es decir, tiene un PEG (polietilenglicol) unido covalentemente) según el método descrito en el documento EP-A-0948544. Preferiblemente, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado PEGilado, tal como se muestra en la figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, el fragmento Fab modificado lleva unido a uno de los restos cisteína del extremo C-terminal de la región bisagra modificada de la cadena pesada un grupo derivado de lisilo-maleimida, en el que cada uno de los dos grupos amino del resto lisilo lleva unido covalentemente un resto metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da, de modo que el peso molecular promedio total de los restos metoxipolietilenglicol es de aproximadamente 40000 Da, y más preferiblemente el grupo derivado de lisilo-maleimida es $[1-[[[2-[[3-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxopropil]amino]etil]amino]carbonil]-1,5-pentanediiil]bis(iminocarbonilo)]$. Un resto lisina está unido covalentemente al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amina en el resto lisina está unido un polímero de metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da. Por tanto, el peso molecular total de la molécula efectora completa es de aproximadamente 40000 Da.

Por consiguiente, el método según la presente invención comprende preferiblemente unir a uno de los restos

cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, en el que cada grupo amino del resto lisilo lleva unido covalentemente un resto metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da.

5 En una realización, una propiedad física de una proteína hospedante contaminante se altera mediante la adición de un marcador de aminoácido al extremo C-terminal o N-terminal. En una realización preferida, la propiedad física que se altera es el punto isoeléctrico, y el marcador de aminoácido es un marcador de poli(ácido aspártico) unido al C-terminal. En una realización, las proteínas de *E. coli* alteradas por la adición de dicho marcador son la proteína de unión a dipéptido (DppA), la proteína de unión a maltosa (MBP), la proteína de unión a tiorredoxina y fosfato (PhoS/PstS). En una realización específica, el pI de la proteína de unión a fosfato (PhoS/PstS) de *E. coli* se reduce de 7,2 a 5,1 mediante la adición de un marcador de poli(ácido aspártico) (poliD), que contiene 6 restos ácido aspártico en el C-terminal.

15 También se prefiere la modificación de restos específicos de la proteína de *E. coli* contaminante para alterar sus propiedades físicas, sola o en combinación con la adición de marcadores N- o C-terminales. Estos cambios pueden incluir inserciones o deleciones para alterar el tamaño de la proteína, o sustituciones de aminoácidos para alterar el pI o la hidrofobicidad. En una realización, estos restos se localizan sobre la superficie de la proteína. En una realización preferida, se alteran restos de la superficie de la proteína PhoS para reducir el pI de la proteína. Preferiblemente, se evitan los restos que se consideran importantes para la unión de fosfato (documento US 5.304.472) para mantener una proteína PhoS funcional.

Ejemplos

20 Líneas celulares

Para todos los experimentos se empleó la línea celular W3110 de *E. coli* como línea de células de tipo salvaje parental.

Se crearon líneas celulares que portan las siguientes mutaciones:

- a. un gen Tsp mutado;
- 25 b. un gen Tsp mutado y que porta DsbC recombinante;
- c. un gen Tsp mutado y un gen spr mutado;
- d. un gen Tsp mutado y un gen spr mutado y que porta DsbC recombinante.

Ejemplo 1: Generación de una línea celular que porta el gen Tsp mutado MXE001 (Δ Tsp)

Se generó la línea MXE001 como sigue:

30 El módulo de Tsp se movió como fragmentos de restricción Sal I, Not I a plásmidos pKO3 restringidos de modo similar. El plásmido pKO3 emplea el mutante sensible a la temperatura del origen de la replicación de pSC101 (*RepA*), junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar los acontecimientos de integración cromosómica. El gen *sacB*, que codifica la levansacarasa, es letal para *E. coli* cultivado sobre sacarosa y por tanto se emplea (junto con el marcador de cloranfenicol y el origen de pSC101) para forzar y seleccionar los acontecimientos de desintegración y de curación del plásmido. Esta metodología ha sido descrita previamente (Hamilton *et al.*, 4617-4622; Blomfield *et al.*, 1447-1457). El sistema de pKO3 elimina todos los marcadores selectivos del genoma del hospedante, excepto por el gen insertado.

35 Se construyeron los siguientes plásmidos:

40 pMXE191 comprende el gen Tsp mutado inactivado, tal como se muestra en SEQ ID NO:28, y comprende los marcadores de restricción *EcoR I* y *Ase I*.

El plásmido después se transformó en células W3110 de *E. coli* electrocompetentes preparadas empleando el método de Miller y Nickoloff, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad (Miller y Nickoloff, 105-113).

45 **Día 1:** Se mezclan 40 μ l de células de *E. coli* con (10 pg) 1 μ l de ADN de pKO3 en una cubeta de electroporación enfriada BioRad de 0,2 cm antes de una electroporación a 2500 V, 25 μ F y 200 Ω . Se añadieron inmediatamente 1000 μ l de 2xPY, y las células se recuperaron mediante agitación a 250 rpm en un incubador a 30 °C durante 1 hora. Las células se diluyeron en serie 1/10 en 2xPY antes de que partes alícuotas de 100 μ l fueran cultivadas en placas de agar 2xPY que contenían cloranfenicol a 20 μ g/ml precalentadas a 30 °C y 43 °C. Las placas se incubaron durante la noche a 30 °C y 43 °C.

50 **Día 2:** El número de colonias cultivadas a 30 °C produjo un cálculo de la eficacia de la electroporación, mientras que las colonias que sobrevivieron cultivadas a 43 °C representan los acontecimientos de integración potenciales. Se

eligieron colonias individuales de la placa de 43 °C y se resuspendieron en 10 ml de 2xPY. De esto, se extrajeron 100 µl y se cultivaron en placas de agar 2xPY que contenían sacarosa al 5% (en p/v) precalentadas a 30 °C para generar colonias individuales. Las placas se incubaron durante la noche a 30 °C.

5 **Día 3:** En este punto, las colonias representan los acontecimientos de desintegración y de curación del plásmido simultáneos potenciales. Si los acontecimientos de desintegración y de curación se producen en un momento temprano del crecimiento, entonces la mayor parte de la masa de la colonia será clonal. Se escogieron colonias individuales y se cultivaron en placas por duplicado en agar 2xPY que contenía cloranfenicol a 20 µg/ml o sacarosa al 5% (en p/v). Las placas se incubaron durante la noche a 30 °C.

10 **Día 4:** Las colonias que crecen en sacarosa y mueren en cloranfenicol representan los acontecimientos de sustitución cromosómica y de curación del plásmido potenciales. Estas se eligieron y se seleccionaron mediante PCR con un oligonucleótido específico de mutación. Las colonias que generaron una banda de PCR positiva con el tamaño correcto se eligieron para producir colonias individuales en agar 2xPY que contenía sacarosa al 5% (en p/v) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C.

15 **Día 5:** Se emplearon colonias individuales positivas en PCR, sensibles a cloranfenicol y resistentes a sacarosa de *E. coli* para preparar disoluciones madre en glicerol, células químicamente competentes y para actuar como moldes de PCR para una reacción de PCR con cebadores oligonucleotídicos flanqueantes 5' y 3' para generar un producto de la PCR para dirigir la secuenciación directa del ADN empleando Taq polimerasa.

20 Se ensayó la cepa de células MXE001 para confirmar la modificación correcta del ADN genómico que porta el gen Tsp mutado mediante amplificación con PCR de la región del gen Tsp que comprende un sitio de restricción Ase I no natural (SEQ ID NO:28), empleando cebadores oligonucleotídicos. Las regiones amplificadas del ADN después se analizaron mediante una electroforesis en gel antes y después de una incubación con la enzima de restricción Ase I para confirmar la presencia del sitio de restricción Ase I no natural en los genes mutados. Este método se realizó como sigue:

25 Se emplearon los siguientes oligos para amplificar el ADN genómico, utilizando PCR, a partir de lisados de células de *E. coli* de MXE001 y W3110:

6284 Tsp 3' 5'-GCATCATAATTTTCTTTTACCTC-3' (SEQ ID NO:47)

6283 Tsp 5' 5'-GGGAAATGAACCTGAGCAAAACGC-3' (SEQ ID NO:48)

30 Los lisados se prepararon calentando una única colonia de células durante 10 minutos a 95 °C en 20 µl de tampón 1 x PCR. Se dejó que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente y después se centrifugó a 13.200 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se etiquetó como "lisado celular".

Cada cepa se amplificó empleando la pareja de oligonucleótidos de Tsp.

El ADN se amplificó empleando un procedimiento de PCR convencional.

5 µl	Tampón x10 (Roche)
1 µl	Mezcla de dNTP (Roche, mezcla 10 mM)
1,5 µl	Oligo 5' (5 pmol)
1,5 µl	Oligo 3' (5 pmol)
2 µl	Lisado celular
0,5 µl	Taq ADN polimerasa (Roche 5 U/µl)
38,5 µl	H ₂ O

Ciclo de PCR.

94 °C	1 minuto
94 °C	1 minuto
55 °C	1 minuto (repetir para 30 ciclos)
72 °C	1 minuto
72 °C	10 minutos

Tras haber completado la reacción se retiraron 25 µl a un nuevo tubo de microcentrífuga para la digestión con Ase I. A los 25 µl de la reacción de PCR se le añadieron 19 µl de H₂O, 5 µl del tampón 3 (New England Biolabs®), 1 µl de Ase I (New England Biolabs®), se mezcló y se incubó a 37 °C durante 2 horas.

5 Al resto de la reacción de PCR se le añadieron 5 µl de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 µl en un gel de agarosa TAE al 0,8% 200 ml (Invitrogen®) más bromuro de etidio (5 µl de una disolución madre 10 mg/ml) y se ejecutó a 100 V durante 1 hora. Se cargaron 10 µl del marcador de tamaño (marcador de ADN Perfect, 0,1-12 Kb, Novagen®) en el carril final.

10 Tras haber completado las digestiones con Ase I se añadieron 10 µl de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 µl sobre un gel de agarosa TAE al 0,8% (Invitrogen® más bromuro de etidio (5 µl de una disolución madre 10 mg/ml) y se ejecutó a 100 V durante 1 hora. Se cargaron 10 µl del marcador de tamaño (marcador de ADN Perfect, 0,1-12 Kb, Novagen®) en el carril final. Ambos geles se visualizaron empleando un transluminador de UV.

15 El fragmento genómico amplificado mostró una banda del tamaño correcto de 2,8 Kb para Tsp. Tras la digestión con Ase I se confirmó la presencia de los sitios Ase I introducidos en la cepa deficiente en Tsp MXE001, pero no en el control de W3110.

MXE001: El ADN genómico se amplificó empleando el conjunto de cebadores de Tsp, y el ADN resultante se digirió con Ase I para producir bandas de 2,2 y 0,6 Kpb.

El ADN amplificado con PCR de W3110 no fue digerido por la enzima de restricción Ase I.

20 **Ejemplo 2: Generación de líneas celulares que portan un gen spr mutado y de líneas celulares que portan un gen Tsp mutado y un gen spr mutado**

Se generaron las mutaciones de spr y se seleccionaron para su utilización en un ensayo de complementación.

25 El gen spr (SEQ ID NO:23) fue mutado empleando un kit de PCR de diversidad de mutagénesis aleatoria de Clontech® que introduce de 1 a 2 mutaciones por 1000 pb. El ADN de PCR con spr mutado se clona en un vector de expresión inducible [pTTO CDP870] que expresa CDP870 Fab' (tal como se describe en el documento WO 01/94585) junto con el spr mutante. Este acoplamiento después se electrotransformó en una cepa de *E. coli* que comprende un variante de deleción de Tsp (Δ Tsp) (denominada MXE001) preparada empleando el método de Miller *et al.* (Miller y Nickoloff, 105-113). Se empleó el siguiente protocolo: se añadieron 40 µl de MXE001 electrocompetente, 2,5 µl del acoplamiento (100 pg de ADN) a una cubeta de electroporación de 0,2 cm, se realizó la electrotransformación empleando BioRad® Genepulser Xcell® con las siguientes condiciones: 2500 V, 25 µF y 30 200 Ω. Después de la electrotransformación se añadió 1 ml de medio S.O.C. (Invitrogen®, n.º de catálogo: 18045-088) (precalentado hasta 37 °C) y se dejó que las células se recuperaron a 37 °C durante 1 hora con agitación suave.

35 Las células se cultivaron en placas de agar hipotónico [extracto de levadura 5 g/l, triptona 2,5 g/l, agar 15 g/l (todos de Difco®)] y se incubaron a 40 °C. Las células que formaron colonias se volvieron a cultivar en placa en HLB a 43 °C para confirmar el restablecimiento de la capacidad para crecer bajo condiciones osmóticas bajas a alta temperatura para la cepa MXE001. Se preparó el ADN plasmídico a partir de los clones seleccionados y se secuenció para identificar las mutaciones de spr.

Empleando este método se aislaron ocho mutaciones individuales, una mutación doble y dos mutaciones múltiples en la proteína spr que complementan al fenotipo Δ Tsp como sigue:

- 40 1. V98E
2. D133A
3. V135D
4. V135G
5. G147C
45 6. S95F y Y115F
7. I70T
8. N31T, Q73R, R100G, G140C
9. R62C, Q99P, R144C
10. L108S

11. L136P

Se emplearon las mutaciones individuales 1 a 5 identificadas anteriormente y tres mutaciones en la tríada catalítica de spr (C94A, H145A, H157A) y W174R para generar nuevas cepas utilizando la cepa W3110 de *E. coli* de tipo salvaje (genotipo: F- LAM- IN (rrnD-rrnE)1 rph1 (ATCC, n.º de catálogo 27325) para crear cepas de spr mutado o la cepa MXE001 de ejemplo 1 para preparar cepas combinadas de ΔTsp/spr mutante.

Se generaron las siguientes cepas de células mutantes de *E. coli* empleando un sistema de vector de sustitución de genes usando el plásmido de sustitución/recombinación homóloga pKO3 (Link *et al.*, *supra*), tal como se describe en el ejemplo 1, para la generación de MXE001.

Tabla 1

Cepa de <i>E. coli</i> mutante	Genotipo	Vectores de spr
MXE001	ΔTsp	-
MXE008	ΔTsp, spr D133A	pMXE339, pKO3 spr D133A (-Sall)
MXE009	ΔTsp, spr H157A	pMXE345, pKO3 spr H157A (-Sall)
MXE010	spr G147C	pMXE338, pKO3 spr G147C (-Sall)
MXE011	spr C94A	pMXE343, pKO3 spr C94A (-Sall)
MXE012	spr H145A	pMXE344, pKO3 spr H145A (-Sall)
MXE013	spr W174R	pMXE346, pKO3 spr W174R (-Sall)
MXE014	ΔTsp, spr V135D	pMXE340, pKO3 spr V135D (-Sall)
MXE015	ΔTsp, spr V98E	pMXE342, pKO3 spr V98E (-Sall)
MXE016	ΔTsp, spr C94A	pMXE343, pKO3 spr C94A (-Sall)
MXE017	ΔTsp, spr H145A	pMXE344, pKO3 spr H145A (-Sall)
MXE018	ΔTsp, spr V135G	pMXE341, pKO3 spr V135G (-Sall)

Los módulos de integración de spr mutante se movieron como fragmentos de restricción Sal I, Not I a plásmidos pKO3 restringidos de modo similar.

Para todos los experimentos se empleó la línea celular de *E. coli* W3110 como la línea celular de tipo salvaje y la línea celular de *E. coli* W3110 ΔTsp, spr C94A (MX016).

15 **Ejemplo 3: Generación del plásmido para la expresión de Fab' anti-CD154 y DsbC**

Se construyó un plásmido que contenía las secuencias de cadena pesada y ligera de un anti-CD154 Fab (SEQ ID NO:13 y 11, respectivamente) y la secuencia que codifica DsbC (SEQ ID NO:27).

Se construyó el plásmido pMXE351 (pTTOD_DsbC), un vector de expresión para el anti-CD154 Fab y DsbC (un polipéptido periplásmico), empleando metodologías de clonación de restricción convencionales. El plásmido pMXE351 contiene las siguientes características: un promotor de *tac* fuerte y una secuencia de operador *lac*. Tal como se muestra en la figura 1, el plásmido contiene un sitio de restricción EcoRI exclusivo después de la región codificadora de la cadena pesada de Fab', seguido de una secuencia no codificadora y después un sitio de restricción NdeI exclusivo. El gen DsbC se clonó mediante PCR empleando el ADN cromosómico bruto de W3110 como molde. Se retiró un sitio EcoRI de la secuencia de DsbC de tipo salvaje mediante extensión de solapamiento con PCR, de modo que el producto de la PCR codificaba un sitio 5' EcoRI, seguido de un sitio de unión a ribosomas fuerte, seguido del codón de inicio nativo, la secuencia señal y una secuencia madura de DsbC, terminando con un marcador de His C-terminal y, por último, un sitio NdeI no codificador. El fragmento de la PCR EcoRI-NdeI se restringió y se acopló en el vector de expresión, de modo que los tres polipéptidos (la cadena ligera de Fab', la cadena pesada de Fab' y DsbC) son codificados sobre un único ARNm policistrónico.

Los genes de la cadena ligera y la cadena pesada de Fab y el gen DsbC se transcribieron como un único mensaje policistrónico. El ADN que codifica el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* se condensó en el extremo 5' de ambas secuencias del gen de cadena pesada y ligera, que dirige la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó empleando un terminador de la transcripción dual *rrnB t1t2*. El gen *lacIq*

codifica la proteína represora de Lac I constitutivamente expresada. Esta transcripción reprimida del promotor de *tac* hasta la eliminación de la represión fue inducida por la presencia de alolactosa u IPTG. El origen de la replicación usado fue p15A, que mantiene un bajo número de copias. El plásmido contiene un gen de resistencia a tetraciclina para la selección con antibióticos.

5 **Ejemplo 4: Expresión de Fab' anti-CD154 y DsbC en *E. coli* W3110 y MXE016 (*E. coli* W3110 ΔTsp, spr C94A)**

Expresión de Fab' anti-CD154 y DsbC en E. coli W3110 ΔTsp, spr C94A

La cepa de células de *E. coli* W3110 ΔTsp, spr C94A (MXE016) se transformó con el plásmido pMXE351 generado en el ejemplo 3. La transformación de las cepas se realizó empleando el método de Chung C.T *et al.* (Chung, Niemela, y Miller, 2172-2175).

10 *Expresión de Fab' anti-CD154 en E. coli W3110*

Se transformó la cepa de células de *E. coli* W3110 con el plásmido pTTOD, un vector de expresión para el Fab' anti-CD154, que se construyó empleando metodologías de clonación de restricción convencionales. El plásmido pTTOD contiene las siguientes características: un promotor de *tac* fuerte y una secuencia de operador *lac*. Los genes de la cadena ligera y la cadena pesada de Fab se transcribieron como un único mensaje dicistrónico. El ADN que codifica el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* se condensó en el extremo 5' de ambas secuencias del gen de cadena pesada y ligera, que dirige la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó empleando un terminador de la transcripción dual *rrnB t1t2*. El gen *lacIq* codifica la proteína represora de Lac I constitutivamente expresada. Esta transcripción reprimida del promotor de *tac* hasta la eliminación de la represión fue inducida por la presencia de alolactosa u IPTG. El origen de la replicación usado fue p15A, que mantiene un bajo número de copias. El plásmido contiene un gen de resistencia a tetraciclina para la selección con antibióticos. La transformación de las cepas se realizó empleando el método de Chung C.T *et al.* (Chung, Niemela, y Miller, 2172-2175).

Ejemplo 5: Crecimiento de cepas de *E. coli* mutadas y expresión de Fab' anti-CD154 en cepas de *E. coli* mutadas empleando fermentaciones de alta densidad

25 Las cepas producidas en el ejemplo 4 se ensayaron en experimentos de fermentación que comparan el crecimiento y la expresión de un Fab' anti-CD154:

Medio de crecimiento, inóculo y etapas de fermentación. El proceso de la fermentación se inicia preparando un inóculo a partir de un vial del banco de células y amplificando a través de varias etapas de precultivo (matraz y reactores) antes de sembrar en el fermentador de producción. En la fermentación de producción, las células se cultivan en medio definido hasta una alta densidad en el modo discontinuo y de alimentación discontinua. Cuando se alcanza la densidad celular deseada se induce la expresión de Fab' mediante la adición de IPTG. La expresión de Fab' se dirige al espacio periplásmico de *E. coli*, en donde Fab' se acumula a lo largo de la fase de inducción. Se aplica una alimentación de una fuente de carbono durante la fase de inducción para controlar la expresión y el crecimiento celular. Se controla la temperatura, el oxígeno disuelto (pO₂) y el pH para mantener el cultivo dentro de las condiciones óptimas de cultivo.

Medición de la concentración de biomasa y tasa de crecimiento. La concentración de biomasa se determina midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Extracción periplásmica. Las células se recolectaron de las muestras de cultivo mediante centrifugación. La fracción del sobrenadante se guarda (a -20 °C) para un posterior análisis. La fracción del sedimento celular se resuspende hasta el volumen original del cultivo en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4). Tras una incubación a 60 °C durante aproximadamente 10 a 16 horas, el extracto se aclaró mediante centrifugación, y la fracción del sobrenadante se empleó fresca o se guardó (a -20 °C) para su análisis.

Cuantificación de Fab'. Se determinaron las concentraciones de Fab' en los extractos periplásmicos y los sobrenadantes de cultivo empleando HPLC de proteína G. Una columna HiTrap® Protein-G HP 1 ml (GE-Healthcare® o equivalente) se cargó con el analito (pH aproximadamente neutro, 30 °C, filtrado a 0,2 μm) a 2 ml/min, la columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4, y después el Fab' se eluyó empleando una inyección de glicina 50 mM/HCl, pH 2,7. El Fab' eluido se midió con A280 en un sistema de HPLC Agilent® 1100 o 1200 y se cuantificó mediante la referencia a una curva patrón de una proteína Fab' purificada de concentración conocida.

50 **Ejemplo 6: Nivel de los fragmentos de cadena ligera en extracciones de fermentación de cepas de *E. coli* mutadas**

Las fermentaciones presentadas en el ejemplo 2 se ensayaron para el nivel de fragmentos de cadena ligera de Fab' anti-CD154 en extracciones periplásmicas.

Cuantificación de los fragmentos de cadena ligera. Se logró el cálculo cuantitativo del nivel de Fab' y fragmentos

proteolíticos de Fab' mediante una HPLC en fase inversa a alta temperatura. La separación se realiza en una columna en fase inversa Poroshell® 300SB-C8 (Agilent Technologies®, n.º de producto 660750-906) a una temperatura de 80 °C. El disolvente de equilibrio es agua de HPLC, TFA al 0,1% (en v/v), y el disolvente de elución es 1-propanol:acetonitrilo 80:20 (en v/v), TFA al 0,03% (en v/v). La separación se realiza con un caudal de 2,0 ml/min, por medio de un gradiente lineal de disolvente B al 16-38% en 4,4 min. La detección fue mediante la absorbancia de UV a 214 nm. Los datos se procesaron mediante integración manual, y la cantidad de fragmentos proteolíticos de Fab se expresa como porcentaje del área de pico con relación al pico de Fab intacto.

La presente invención también proporciona una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende el anticuerpo producido mediante el método de la presente invención, en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende mezclar el anticuerpo producido mediante el método de la presente invención, junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Lista de referencias bibliográficas

- 15 Aramini, J. M., *et al.*, "Solution NMR structure of the NlpC/P60 domain of lipoprotein Spr from *Escherichia coli*: structural evidence for a novel cysteine peptidase catalytic triad", *Biochemistry*, 47.37 (2008), 9715-9717.
- Bachmann, B. J., "Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12", *Bacteriol. Rev.*, 36.4 (1972), 525-557.
- Backlund, E., *et al.*, "Fedbatch design for periplasmic product retention in *Escherichia coli*", *J. Biotechnol.*, 135.4 (2008), 358-365.
- 20 Blomfield, I. C., *et al.*, "Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon", *Mol. Microbiol.*, 5.6 (1991), 1447-1457.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, y R. H. Miller, "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86.7 (1989), 2172-2175.
- Hamilton, C. M., *et al.*, "New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 171.9 (1989), 4617-4622.
- Hara, H., *et al.*, "Overproduction of penicillin-binding protein 7 suppresses thermosensitive growth defect at low osmolarity due to an spr mutation of *Escherichia coli*", *Microb. Drug Resist.*, 2.1 (1996), 63-72.
- Hara, H., *et al.*, "Cloning, mapping, and characterization of the *Escherichia coli* prc gene, which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3", *J. Bacteriol.*, 173.15 (1991), 4799-4813.
- 30 Holliger, P. y P. J. Hudson, "Engineered antibody fragments and the rise of single domains", *Nat. Biotechnol.*, 23.9 (2005), 1126-1136.
- Humphreys, D. P., *et al.*, "Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions", *J. Immunol. Methods*, 209.2 (1997), 193-202.
- 35 Keiler, K. C. y R. T. Sauer, "Identification of active site residues of the Tsp protease", *J. Biol. Chem.*, 270.48 (1995), 28864-28868.
- Link, A. J., D. Phillips, y G. M. Church, "Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization", *J. Bacteriol.*, 179.20 (1997), 6228-6237.
- 40 Makrides, S. C., "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*", *Microbiol. Rev.*, 60.3 (1996), 512-538.
- Miller, E. M. y J. A. Nickoloff, "*Escherichia coli* electrotransformation", *Methods Mol. Biol.*, 47:105-113 (1995), 105-113.
- 45 Missiakas, D., C. Georgopoulos, y S. Raina, "The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation", *EMBO J.*, 13.8 (1994), 2013-2020.
- Nagasawa, H., *et al.*, "Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 171.11 (1989), 5890-5893.
- Shevchik, V. E., G. Condemine, y J. Robert-Baudouy, "Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity", *EMBO J.*, 13.8 (1994), 2007-2012.

Silber, K. R., K. C. Keiler, y R. T. Sauer, "Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89.1 (1992), 295-299.

Silber, K. R. y R. T. Sauer, "Deletion of the prc (tsp) gene provides evidence for additional tail-specific proteolytic activity in *Escherichia coli* K-12", Mol. Gen. Genet., 242.2 (1994), 237-240.

5 **Listado de secuencias**

<110> UCB Pharma, S.A.

<120> CEPA HOSPEDANTE BACTERIANA QUE EXPRESA FRAGMENTO DE ANTICUERPO RECOMBINANTE

10

<130> G0157 WO

<150> EP11173880.3

<151> 13-07-2011

15

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-H1

<400> 1

30

Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr His Val His
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-H2

40

<400> 2

Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50

<223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-H3

<400> 3

Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala
1 5 10

55

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

```

<223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-L1
<400> 4
5   Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn Leu Ala
   1           5           10
   <210> 5
   <211> 7
   <212> PRT
10  <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-L2
15  <400> 5
   Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp
   1           5
   <210> 6
20  <211> 9
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
25  <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 CDR-L3
   <400> 6
   Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe Thr
   1           5
30  <210> 7
   <211> 384
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial
35  <220>
   <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 cadena ligera variable (gL4)
   <220>
40  <221> peptide_senial
   <222> (1)..(63)
   <220>
   <221> CDS
45  <222> (64)..(384)
   <400> 7
   atgaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgsaa           60
   gct gat atc cag atg acc cag agt cca agc agt ctc tcc gcc agc gta           108
     Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
     1           5           10           15
   ggc gat cgt gtg act att acc tgt cgt gcc agt gag gac ctc tat tac           156
   Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr
50

```

ES 2 659 155 T3

	20		25		30	
aac ctg gcc tgg tat cag cgt aaa ccg ggc aaa gcc ccg aag ctg ctc						204
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu	35		40		45	
atc tat gat acg tac cgc ctg gct gac ggt gtg cca agc cgt ttc agt						252
Ile Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser	50		55		60	
ggc agt ggc agc ggt act gac tat acc ctc aca att tcg tct ctc cag						300
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln	65		70		75	
ccg gaa gat ttc gcc tct tac tat tgt cag caa tat tac aag ttc cct						348
Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro	80		85		90	95
ttc acc ttc ggt cag ggc act aaa gta gaa atc aaa						384
Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100		105			

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 9
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 Cadena variable pesada (gH1)

<220>
 <221> CDS
 25 <222> (1)..(351)

<400> 9

ES 2 659 155 T3

gag gtg cag ctg gtc gag tct gga ggc ggg ctt gtc cag cct ggt ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

agc ctg cgt ctc tct tgt gca gtg agc ggc ttc agc tct acc aat tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

cat gtg cac tgg gtg cgt cag gca cct ggg aag ggc ctg gag tgg atg 144
 His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ggt gtt att tgg ggc gac ggc gat aca tcc tac aac tcc gtc ctg aag 192
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60

agc cgt ttc acc att tcc cgt gac acc tca aag aat acc gtt tac ctc 240
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

cag atg aac tct ctc cgc gca gag gac aca gca gtc tat tac tgt gca 288
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

cgt caa ctg acc cac tat tac gtt ttg gca gcc tgg ggt caa ggg act 336
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ctg gtc aca gtc tcg 351
 Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 11
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 659 155 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 gL4 (V+C)

<220>

<221> CDS

5 <222> (64)..(705)

<400> 11

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttgctg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gct gat atc cag atg acc cag agt cca agc agt ctc tcc gcc agc gta      108
  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1                               5                               10          15
ggc gat cgt gtg act att acc tgt cgt gcc agt gag gac ctc tat tac      156
  Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr
                               20          25          30
aac ctg gcc tgg tat cag cgt aaa ccg gcc aaa gcc ccg aag ctg ctc      204
  Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
  35                               40          45
atc tat gat acg tac cgc ctg gct gac ggt gtg cca agc cgt ttc agt      252
  Ile Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
  50                               55          60
ggc agt gcc agc ggt act gac tat acc ctc aca att tcg tct ctc cag      300
  Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
  65                               70          75
ccg gaa gat ttc gcc tct tac tat tgt cag caa tat tac aag ttc cct      348
  Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro
  80                               85          90          95
ttc acc ttc ggt cag gcc act aaa gta gaa atc aaa cgt acg gta gcg      396
  Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
  100                              105          110
gcc cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct      444
  Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
  115                              120          125
gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag      492
  Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
  130                              135          140
gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc      540
  Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
  145                              150          155
cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc      588
  Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
  160                              165          170          175
agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc      636
  Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
  180                              185          190
tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag gcc ctg agc tca cca gta aca aaa      684
  Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
  195                              200          205
agt ttt aat aga ggg gag tgt      705
  Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210

```

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 12

ES 2 659 155 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- 5 <210> 13
- <211> 726
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 gH1 Fab (no bisagra) HC con región constante
- <220>
- <221> CDS
- <222> (64)..(726)
- 15 <400> 13

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gct gag gtt cag ctg gtc gag tct gga ggc ggg ctt gtc cag cct ggt 108
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 ggg agc ctg cgt ctc tct tgt gca gtg agc ggc ttc agc tct acc aat 156
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn
 20 25 30

ES 2 659 155 T3

tac cat gtg cac tgg gtg cgt cag gca cct ggg aag ggc ctg gag tgg 204
Tyr His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

atg ggt gtt att tgg ggc gac ggc gat aca tcc tac aac tcc gtc ctg 252
Met Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu
50 55 60

aag agc cgt ttc acc att tcc cgt gac acc tca aag aat acc gtt tac 300
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75

ctc cag atg aac tct ctc cgc gca gag gac aca gca gtc tat tac tgt 348
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80 85 90 95

gca cgt caa ctg acc cac tat tac gtt ttg gca gcc tgg ggt caa ggg 396
Ala Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly
100 105 110

act ctg gtc aca gtc tcg agc gct tct aca aag ggc cca tcg gtc ttc 444
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg 492
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg 540
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155

aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta 588
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
160 165 170 175

cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc 636
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc 684
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

agc aac acc aag gtc gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt 726
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Cys
210 215 220

<210> 14
<211> 221
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

ES 2 659 155 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30
 His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

- <210> 15
- <211> 750
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 gH1 Fab' HC con región constante
- <220>
- <221> CDS
- <222> (64)..(750)
- 15 <400> 15

ES 2 659 155 T3

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60

gct gag gtt cag ctg gtc gag tct gga ggc ggg ctt gtc cag cct ggt 108
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

ggg agc ctg cgt ctc tct tgt gca gtg agc ggc ttc agc tct acc aat 156
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn
 20 25 30

tac cat gtg cac tgg gtg cgt cag gca cct ggg aag ggc ctg gag tgg 204
 Tyr His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

atg ggt gtt att tgg ggc gac ggc gat aca tcc tac aac tcc gtc ctg 252
 Met Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu
 50 55 60

aag agc cgt ttc acc att tcc cgt gac acc tca aag aat acc gtt tac 300
 Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75

ctc cag atg aac tct ctc cgc gca gag gac aca gca gtc tat tac tgt 348
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 80 85 90 95

gca cgt caa ctg acc cac tat tac gtt ttg gca gcc tgg ggt caa ggg 396
 Ala Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

act ctg gtc aca gtc tcg agc gct tct aca aag ggc cca tcg gtc ttc 444
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg 492
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg 540
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155

aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta 588
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr 165 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 160 170 175

cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc 636
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc 684
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

agc aac acc aag gtc gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa 732
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

act cac aca tgc gcc ggc 750
 Thr His Thr Cys Ala Ala

- 5 <210> 16
- <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción sintética
- <400> 16

ES 2 659 155 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30
 His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Ala Ala
 225

5 <210> 17
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: hu342 kappa LC

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(711)

<400> 17

ES 2 659 155 T3

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg cta ctc tgg 48
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

ctc cga ggt gcc aga tgt gat atc cag atg acc cag agt cca agc agt 96
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

ctc tcc gcc agc gta ggc gat cgt gtg act att acc tgt cgt gcc agt 144
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

gag gac ctc tat tac aac ctg gcc tgg tat cag cgt aaa ccg gcc aaa 192
 Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

gcc ccg aag ctg ctc atc tat gat acg tac cgc ctg gct gac ggt gtg 240
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val
 65 70 75 80

cca agc cgt ttc agt ggc agt ggc agc ggt act gac tat acc ctc aca 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
 85 90 95

att tcg tct ctc cag ccg gaa gat ttc gcc tct tac tat tgt cag caa 336
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

tat tac aag ttc cct ttc acc ttc ggt cag ggc act aaa gta gaa atc 384
 Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat 432
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac 480
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc 528
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 576
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac 624
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc 672
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 711
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 18
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

ES 2 659 155 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

- 5 <210> 19
 <211> 1392
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: hu342 aglyP-hulG4 HC
 <220>
 <221> CDS
- 15 <222> (1)..(1392)
 <400> 19

ES 2 659 155 T3

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly 1 5 10 15	48
gcc cac tcc gaa gta caa ttg gtc gag tct gga ggc ggg ctt gtc cag Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Ser Gly Gly Leu Val Gln 20 25 30	96
cct ggt ggg agc ctg cgt ctc tct tgt gca gtg agc ggc ttc agc tct Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser 35 40 45	144
acc aat tac cat gtg cac tgg gtg cgt cag gca cct ggg aag ggc ctg Thr Asn Tyr His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60	192
gag tgg atg ggt gtt att tgg ggc gac ggc gat aca tcc tac aac tcc Glu Trp Met Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser 65 70 75 80	240
gtc ctg aag agc cgt ttc acc att tcc cgt gac acc tca aag aat acc Val Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr 85 90 95	288
gtt tac ctc cag atg aac tct ctc cgc gca gag gac aca gca gtc tat Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr 100 105 110	336
tac tgt gca cgt caa ctg acc cac tat tac gtt ttg gca gcc tgg ggt Tyr Cys Ala Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly 115 120 125	384
caa ggg act ctg gtc aca gtc tcg agc gct tca acc aag ggc cca tcc Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser 130 135 140	432
gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc aga tct acc tcc gag agc aca gcc Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala 145 150 155 160	480
gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val 165 170 175	528
tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala 180 185 190	576
gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val 195 200 205	624
ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc tac acc tgc aac gta gat cac Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His 210 215 220	672
aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag tcc aaa tat ggt Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly 225 230 235 240	720
ccc cca tgc cca ccg tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca Pro Pro Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser 245 250 255	768
gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 260 265 270	816
acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro 275 280 285	864
gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat gcc Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 290 295 300	912
aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc gcg tac cgt gtg gtc Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val 305 310 315 320	960
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 1008	1008

ES 2 659 155 T3

				325					330				335					
aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	ccg	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc			1056
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr			
			340					345					350					
atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gag	cca	caa	gtg	tac	acc	ctg			1104
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu			
		355					360					365						
ccc	cca	tcc	cag	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc			1152
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys			
	370					375					380							
ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc			1200
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser			
	385				390					395					400			
aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtc	ctc	gat			1248
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp			
				405					410					415				
tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	agg	cta	acc	gtg	gac	aag	agc			1296
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser			
			420					425					430					
agg	tgg	cag	gag	ggg	aat	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct			1344
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala			
		435				440						445						
ctg	cac	aac	cac	tac	aca	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ctg	ggt	tga			1392
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly				
	450					455					460							

<210> 20

<211> 463

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 20

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Cys	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly			
1				5					10					15				
Ala	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln			
			20					25					30					
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser			
		35					40					45						
Thr	Asn	Tyr	His	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu			
	50					55					60							
Glu	Trp	Met	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Ser			
65					70					75					80			

ES 2 659 155 T3

Val Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

ES 2 659 155 T3

325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450 455 460

<210> 21
 <211> 1438
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 gL4gH1 VH3 (V+C) Fab (no bisagra) vector ADN

10

<400> 21
 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttgctg gtttcgctac cgtagcgsaa 60
 gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
 ccgggcaaaag ccccgaagct gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cggtgtgcca 240
 agccgtttca gtggcagtgg cagcggctact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
 ccggaagatt tcgctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
 cagggcacta aagtagaaat caaacgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttcccg 420
 ccattctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540

ES 2 659 155 T3

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 ggcttgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac 720
 tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg tttccgacc gtggcgcaag ctgaggttca 780
 gctggtcgag tctggaggcg ggcttgcca gcctggggg agcctgcgtc tctcttgtgc 840
 agtgagcggc ttcagctcta ccaattacca tgtgactgg gtgcgtcagg cacctgggaa 900
 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca actccgtcct 960
 gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat accgtttacc tccagatgaa 1020
 ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta ttactgtgca cgtcaactga cccactatta 1080
 cgttttggca gcctggggtc aagggactct ggtcacagtc tcgagcgctt ctacaaaggg 1140
 cccatcggtc tccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1200
 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1260
 cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 1320
 cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1380
 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgttaa 1438

<210> 22
 <211> 1459
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: 342 gL4gH1 VH3 (V+C) Fab' vector ADN

10

<400> 22
 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttgctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
 cggggcaaag ccccgaaact gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgcca 240
 agccgtttca gtggcagtgg cagcggctact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
 cagggcacta aagtagaat caaacgtacg gtacggccc catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660

ES 2 659 155 T3

```

ggcctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac 720
tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg ttctgccacc gtggcgcaag ctgaggttca 780
gctggtcgag tctggaggcg ggcttgtcca gcctggtggg agcctgcgtc tctcttgtgc 840
agtgagcggc ttcagctcta ccaattacca tgtgcaactgg gtgctgacagg cacctgggaa 900
gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca actccgtcct 960
gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat accgtttacc tccagatgaa 1020
ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta ttactgtgca cgtcaactga cccactatta 1080
cgttttggca gcctggggtc aagggactct ggtcacagtc tcgagcgctt ctacaaaggg 1140
cccacggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1200
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1260
cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 1320
cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1380
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtcga caagaaagt gagcccaat cttgtgacaa 1440
aactcacaca tgcgcccgcg 1459

```

```

5 <210> 23
  <211> 986
  <212> ADN
  <213> Escherichia coli

```

```

10 <220>
  <221> CDS
  <222> (379)..(945)

```

```

15 <300>
  <308> GenBank / D86610
  <309> 10-01-2009
  <313> (1)..(986)

```

```

<400> 23
atagtgagga taatcctgat gatgctcacc gtgctttcat ctatcgaacg caaaaatcat 60
tctctaagta aatgaatgga ttgcatgctg ttcactcaat tgtactttaa ttgaccaacc 120
ccgcttatta actttctgta tcactttttc ttataaaaaa tcatgtaaaa ccgctcgcca 180
agaccgcacc aatcgggtaa tctcgaactc gttttgcctc ggcggtagat tatectcaca 240
gcatataatt ttgtgctgta gtccacagat ttggccttaa ggaattgttt caacatgccc 300
aggtaattag tctcgtgtcg cttggcattt tttataacg atatttgtcg ttaaggactt 360
caagggaaaa caaacaac atg gtc aaa tct caa ccg att ttg aga tat atc 411
                Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile
                1                5                10
ttg cgc ggg att ccc gcg att gca gta gcg gtt ctg ctt tct gca tgt 459
Leu Arg Gly Ile Pro Ala Ile Ala Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Cys

```

20

ES 2 659 155 T3

	15	20	25	
	agt gca aat aac acc gca aag aat atg cat cct gag aca cgt gca gtg Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val			507
	ggt agt gaa aca tca tca ctg caa gct tct cag gat gaa ttt gaa aac Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn			555
	ctg gtt cgt aat gtc gac gta aaa tcg cga att atg gat cag tat gct Leu Val Arg Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala			603
	gac tgg aaa ggc gta cgt tat cgt ctg ggc ggc agc act aaa aaa ggt Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly			651
	atc gat tgt tct ggt ttc gta cag cgt aca ttc cgt gag caa ttt ggc Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly			699
	tta gaa ctt ccg cgt tcg act tac gaa cag cag gaa atg ggt aaa tct Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser			747
	gtt tcc cgc agt aat ttg cgt acg ggt gat tta gtt ctg ttc cgt gcc Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala			795
	ggt tca acg gga cgc cat gtc ggt att tat atc ggc aac aat cag ttt Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe			843
	gtc cat gct tcc acc agc agt ggt gtt att att tcc agc atg aat gaa Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu			891
	ccg tac tgg aag aag cgt tac aac gaa gca cgc cgg gtt ctc agc cgc Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg			939
	agc taa taaaccgttt ggatgcaatc ccttggtat cctgacgagt t Ser			986

<210> 24
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 24

Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro 1 5 10 15
Ala Ile Ala Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Cys Ser Ala Asn Asn Thr 20 25 30
Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val Gly Ser Glu Thr Ser

10

ES 2 659 155 T3

```

          35              40              45
Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg Asn Val
 50                    55                    60
Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val
 65                    70                    75                    80
Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly
                        85                    90                    95
Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly Leu Glu Leu Pro Arg
          100                    105                    110
Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser Val Ser Arg Ser Asn
          115                    120                    125
Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly Arg
          130                    135                    140
His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr
          145                    150                    155                    160
Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu Pro Tyr Trp Lys Lys
          165                    170                    175
Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser
          180                    185

```

5 <210> 25
 <211> 2196
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (69)..(2117)

15 <220>
 <221> peptido señal
 <222> (69)..(134)

20 <300>
 <308> GenBank / M75634
 <309> 26-04-1993
 <313> (1)..(2196)

```

<400> 25
gaattcgggt atgtctttga ttgtgcgcgc agaacacctg gtgttctgaa acggaggccg      60
ggccaggc atg aac atg ttt ttt agg ctt acc gcg tta gct ggc ctg ctt      110
          Met Asn Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu

```

ES 2 659 155 T3

1			5			10										
gca Ala 15	ata Ile	gca Ala	ggc Gly	cag Gln	acc Thr 20	ttc Phe	gct Ala	gta Val	gaa Glu	gat Asp 25	atc Ile	acg Thr	cgt Arg	gct Ala	gat Asp 30	158
caa Gln	att Ile	ccg Pro	gta Val	tta Leu 35	aag Lys	gaa Glu	gag Glu	acg Thr	cag Gln 40	cat His	gcg Ala	acg Thr	gta Val	agt Ser 45	gag Glu	206
cgc Arg	gta Val	acg Thr	tcg Ser 50	cgc Arg	ttc Phe	acc Thr	cgt Arg	tct Ser 55	cat His	tat Tyr	cgc Arg	cag Gln	ttc Phe 60	gac Asp	ctc Leu	254
gat Asp	cag Gln	gca Ala 65	ttt Phe	tcg Ser	gcc Ala	aaa Lys	atc Ile 70	ttt Phe	gac Asp	cgc Arg	tac Tyr	ctg Leu 75	aat Asn	ctg Leu	ctc Leu	302
gat Asp 80	tac Tyr	agc Ser	cac His	aac Asn	gtg Val	ctg Leu 85	ctg Leu	gca Ala	agc Ser	gat Asp	gtt Val 90	gaa Glu	cag Gln	ttc Phe	gcg Ala	350
aaa Lys 95	aag Lys	aaa Lys	acc Thr	gag Glu	tta Leu 100	ggc Gly	gat Asp	gaa Glu	ctg Leu	cgt Arg 105	tca Ser	ggc Gly	aaa Lys	ctc Leu	gac Asp 110	398
gtt Val	ttc Phe	tac Tyr	gat Asp	ctc Leu 115	tac Tyr	aat Asn	ctg Leu	gcg Ala	caa Gln 120	aag Lys	cgc Arg	cgt Arg	ttt Phe 125	gag Glu	cgt Arg	446
tac Tyr	cag Gln	tac Tyr	gct Ala 130	ttg Leu	tcg Ser	gta Val	ctg Leu	gaa Glu 135	aag Lys	ccg Pro	atg Met	gat Asp	ttc Phe 140	acc Thr	ggc Gly	494
aac Asn	gac Asp	act Thr 145	tat Tyr	aac Asn	ctt Leu	gac Asp	cgc Arg 150	agc Ser	aaa Lys	gcg Ala	ccc Pro	tgg Trp 155	ccg Pro	aaa Lys	aac Asn	542
gag Glu 160	gct Ala	gag Glu	ttg Leu	aac Asn	gcg Ala 165	ctg Leu 165	tgg Trp	gac Asp	agt Ser	aaa Lys	gtc Val 170	aaa Lys	ttc Phe	gac Asp	gag Glu	590
tta Leu 175	agc Ser	ctg Leu	aag Lys	ctg Leu	aca Thr 180	gga Gly	aaa Lys	acg Thr	gat Asp	aaa Lys 185	gaa Glu	att Ile	cgt Arg	gaa Glu	acc Thr 190	638
ctg Leu	act Thr	cgc Arg	cgc Arg	tac Tyr 195	aaa Lys	ttt Phe	gcc Ala	att Ile	cgt Arg 200	cgt Arg	ctg Leu	gcg Ala	caa Gln	acc Thr 205	aac Asn	686
agc Ser	gaa Glu	gat Asp	gtt Val 210	ttc Phe	tcg Ser	ctg Leu	gca Ala 215	atg Met	acg Thr	gcg Ala	ttt Phe	gcg Ala	cgt Arg 220	gaa Glu	atc Ile	734
gac Asp	ccg Pro	cat His 225	acc Thr	aac Asn	tat Tyr	ctt Leu	tcc Ser 230	ccg Pro	cgt Arg	aat Asn	acc Thr	gaa Glu 235	cag Gln	ttc Phe	aac Asn	782
act Thr 240	gaa Glu	atg Met	agt Ser	ttg Leu	tcg Ser	ctg Leu 245	gaa Glu	ggt Gly	att Ile	ggc Gly	gca Ala 250	gtg Val	ctg Leu	caa Gln	atg Met	830
gat Glu	gat Glu	gac Glu	tac Glu	acc Glu	gtt Glu	atc Glu	aat Glu	tcg Glu	atg Glu	gtg Glu	gca Ala	ggt Glu	ggt Glu	ccg Glu	gca Glu	878

ES 2 659 155 T3

Asp 255	Asp	Asp	Tyr	Thr	Val 260	Ile	Asn	Ser	Met	Val 265	Ala	Gly	Gly	Pro	Ala 270	
gcg Ala	aag Lys	agt Ser	aaa Lys	gct Ala 275	atc Ile	agc Ser	gtt Val	ggt Gly	gac Asp 280	aaa Lys	att Ile	gtc Val	ggt Gly 285	ggt Val 285	ggt Gly	926
caa Gln	aca Thr	ggc Gly	aag Lys 290	ccg Pro	atg Met	gtt Val	gac Asp	gtg Val 295	att Ile	ggc Gly	tgg Trp	cgt Arg	ctt Leu 300	gat Asp	gat Asp	974
gtg Val	ggt Val	gcc Ala 305	tta Leu	att Ile	aaa Lys	ggg Gly	ccg Pro 310	aag Lys	ggc Gly	agt Ser	aaa Lys	ggt Val 315	cgt Arg	ctg Leu	gaa Glu	1022
att Ile 320	tta Leu	cct Pro	gct Ala	ggt Gly	aaa Lys	ggg Gly 325	acc Thr	aag Lys	acc Thr	cgt Arg	act Thr 330	gta Val	acg Thr	ttg Leu	acc Thr	1070
cgt Arg 335	gaa Glu	cgt Arg	att Ile	cgt Arg	ctc Leu 340	gaa Glu	gac Asp	cgc Arg	gcg Ala	ggt Val 345	aaa Lys	atg Met	tcg Ser	gtg Val	aag Lys 350	1118
acc Thr	gtc Val	ggt Gly	aaa Lys	gag Glu 355	aaa Lys	gtc Val	ggc Gly	gtg Val	ctg Leu 360	gat Asp	att Ile	ccg Pro	ggc Gly	ttc Phe 365	tat Tyr	1166
gtg Val	ggt Gly	ttg Leu	aca Thr 370	gac Asp	gat Asp	gtc Val	aaa Lys	gtg Val 375	caa Gln	ctg Leu	cag Gln	aaa Lys	ctg Leu 380	gaa Glu	aaa Lys	1214
cag Gln	aat Asn	gtc Val 385	agc Ser	agc Ser	gtc Val	atc Ile	atc Ile 390	gac Asp	ctg Leu	cgt Arg	agc Ser	aat Asn 395	ggc Gly	ggt Gly	ggg Gly	1262
gcg Ala	tta Leu 400	act Thr	gaa Glu	gcc Ala	gta Val	tcg Ser 405	ctc Leu	tcc Ser	ggt Gly	ctg Leu	ttt Phe 410	att Ile	cct Pro	gcg Ala	ggt Gly	1310
ccc Pro 415	att Ile	ggt Val	cag Gln	gtc Val	cgc Arg 420	gat Asp	aac Asn	aac Asn	ggc Gly	aag Lys 425	ggt Val	cgt Arg	gaa Glu	gat Asp	agc Ser 430	1358
gat Asp	acc Thr	gac Asp	gga Gly 435	cag Gln	gtt Val	ttc Phe	tat Tyr	aaa Lys	ggc Gly 440	ccg Pro	ctg Leu	gtg Val	gtg Val 445	ctg Leu	gtt Val	1406
gac Asp	cgc Arg	ttc Phe 450	agt Ser	gct Ala	tcg Ser	gct Ala	tca Ser	gaa Glu 455	atc Ile	ttt Phe	gcc Ala	gcg Ala	gca Ala 460	atg Met	cag Gln	1454
gat Asp	tac Tyr	ggt Gly 465	cgt Arg	gcg Ala	ctg Leu	gtt Val	gtg Val 470	ggt Gly	gaa Glu	ccg Pro	acg Thr	ttt Phe 475	ggt Gly	aaa Lys	ggc Gly	1502
acc Thr 480	ggt Val	cag Gln	caa Gln	tac Tyr	cgt Arg	tca Ser 485	ttg Leu	aac Asn	cgt Arg	att Ile	tac Tyr 490	gat Asp	cag Gln	atg Met	tta Leu	1550
cgt Arg 495	cct Pro	gaa Glu	tgg Trp	cca Pro	gcg Ala 500	ctg Leu	ggt Gly	tct Ser	gtg Val	cag Gln 505	tac Tyr	acg Thr	atc Ile	cag Gln	aaa Lys 510	1598

ES 2 659 155 T3

ttc tat cgc gtt aac ggc ggc agt acg caa cgt aaa ggc gta acg cca 1646
 Phe Tyr Arg Val Asn Gly Gly Ser Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Pro
 515 520 525
 gac atc atc atg ccg acg ggt aat gaa gaa acg gaa acg ggt gag aaa 1694
 Asp Ile Ile Met Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys
 530 535 540
 ttc gaa gat aac gcg ctg ccg tgg gat agc att gat gcc gcg act tat 1742
 Phe Glu Asp Asn Ala Leu Pro Trp Asp Ser Ile Asp Ala Ala Thr Tyr
 545 550 555
 gtg aaa tca gga gat tta acg gcc ttt gaa ccg gag ctg ctg aag gaa 1790
 Val Lys Ser Gly Asp Leu Thr Ala Phe Glu Pro Glu Leu Leu Lys Glu
 560 565 570
 cat aat gcg cgt atc gcg aaa gat cct gag ttc cag aac atc atg aag 1838
 His Asn Ala Arg Ile Ala Lys Asp Pro Glu Phe Gln Asn Ile Met Lys
 575 580 585 590
 gat atc gcg cgc ttc aac gct atg aag gac aag cgc aat atc gtt tct 1886
 Asp Ile Ala Arg Phe Asn Ala Met Lys Asp Lys Arg Asn Ile Val Ser
 595 600 605
 ctg aat tac gct gtg cgt gag aaa gag aat aat gaa gat gat gcg acg 1934
 Leu Asn Tyr Ala Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr
 610 615 620
 cgt ctg gcg cgt ttg aac gaa cgc ttt aaa cgc gaa ggt aaa ccg gag 1982
 Arg Leu Ala Arg Leu Asn Glu Arg Phe Lys Arg Glu Gly Lys Pro Glu
 625 630 635
 ttg aag aaa ctg gat gat cta ccg aaa gat tac cag gag ccg gat cct 2030
 Leu Lys Lys Leu Asp Asp Leu Pro Lys Asp Tyr Gln Glu Pro Asp Pro
 640 645 650
 tat ctg gat gag acg gtg aat atc gca ctc gat ctg gcg aag ctt gaa 2078
 Tyr Leu Asp Glu Thr Val Asn Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Leu Glu
 655 660 665 670
 aaa gcc aga ccc gcg gaa caa ccc gct ccc gtc aag taa tatcaatcag 2127
 Lys Ala Arg Pro Ala Glu Gln Pro Ala Pro Val Lys
 675 680
 gcacaagaaa ttgtgcctga tttttaaca gcgacaagat gccgtaaadc agatgctaca 2187
 aaatgtaaa 2196

<210> 26
 <211> 682
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 26

Met Asn Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile
1 5 10 15

Ala Gly Gln Thr Phe Ala Val Glu Asp Ile Thr Arg Ala Asp Gln Ile
20 25 30

5

10

ES 2 659 155 T3

Pro Val Leu Lys Glu Glu Thr Gln His Ala Thr Val Ser Glu Arg Val
 35 40 45
 Thr Ser Arg Phe Thr Arg Ser His Tyr Arg Gln Phe Asp Leu Asp Gln
 50 55 60
 Ala Phe Ser Ala Lys Ile Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Leu Leu Asp Tyr
 65 70 75 80
 Ser His Asn Val Leu Leu Ala Ser Asp Val Glu Gln Phe Ala Lys Lys
 85 90 95
 Lys Thr Glu Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Asp Val Phe
 100 105 110
 Tyr Asp Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Lys Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Gln
 115 120 125
 Tyr Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys Pro Met Asp Phe Thr Gly Asn Asp
 130 135 140
 Thr Tyr Asn Leu Asp Arg Ser Lys Ala Pro Trp Pro Lys Asn Glu Ala
 145 150 155 160
 Glu Leu Asn Ala Leu Trp Asp Ser Lys Val Lys Phe Asp Glu Leu Ser
 165 170 175
 Leu Lys Leu Thr Gly Lys Thr Asp Lys Glu Ile Arg Glu Thr Leu Thr
 180 185 190
 Arg Arg Tyr Lys Phe Ala Ile Arg Arg Leu Ala Gln Thr Asn Ser Glu
 195 200 205
 Asp Val Phe Ser Leu Ala Met Thr Ala Phe Ala Arg Glu Ile Asp Pro
 210 215 220
 His Thr Asn Tyr Leu Ser Pro Arg Asn Thr Glu Gln Phe Asn Thr Glu
 225 230 235 240
 Met Ser Leu Ser Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Gln Met Asp Asp
 245 250 255
 Asp Tyr Thr Val Ile Asn Ser Met Val Ala Gly Gly Pro Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ser Lys Ala Ile Ser Val Gly Asp Lys Ile Val Gly Val Gly Gln Thr
 275 280 285

ES 2 659 155 T3

Gly Lys Pro Met Val Asp Val Ile Gly Trp Arg Leu Asp Asp Val Val
 290 295 300

Ala Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Ser Lys Val Arg Leu Glu Ile Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Gly Lys Gly Thr Lys Thr Arg Thr Val Thr Leu Thr Arg Glu
 325 330 335

Arg Ile Arg Leu Glu Asp Arg Ala Val Lys Met Ser Val Lys Thr Val
 340 345 350

Gly Lys Glu Lys Val Gly Val Leu Asp Ile Pro Gly Phe Tyr Val Gly
 355 360 365

Leu Thr Asp Asp Val Lys Val Gln Leu Gln Lys Leu Glu Lys Gln Asn
 370 375 380

Val Ser Ser Val Ile Ile Asp Leu Arg Ser Asn Gly Gly Gly Ala Leu
 385 390 395 400

Thr Glu Ala Val Ser Leu Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ala Gly Pro Ile
 405 410 415

Val Gln Val Arg Asp Asn Asn Gly Lys Val Arg Glu Asp Ser Asp Thr
 420 425 430

Asp Gly Gln Val Phe Tyr Lys Gly Pro Leu Val Val Leu Val Asp Arg
 435 440 445

Phe Ser Ala Ser Ala Ser Glu Ile Phe Ala Ala Ala Met Gln Asp Tyr
 450 455 460

Gly Arg Ala Leu Val Val Gly Glu Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Val
 465 470 475 480

Gln Gln Tyr Arg Ser Leu Asn Arg Ile Tyr Asp Gln Met Leu Arg Pro
 485 490 495

Glu Trp Pro Ala Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr Ile Gln Lys Phe Tyr
 500 505 510

Arg Val Asn Gly Gly Ser Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Pro Asp Ile
 515 520 525

Ile Met Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu

ES 2 659 155 T3

530

535

540

Asp Asn Ala Leu Pro Trp Asp Ser Ile Asp Ala Ala Thr Tyr Val Lys
545 550 555 560

Ser Gly Asp Leu Thr Ala Phe Glu Pro Glu Leu Leu Lys Glu His Asn
565 570 575

Ala Arg Ile Ala Lys Asp Pro Glu Phe Gln Asn Ile Met Lys Asp Ile
580 585 590

Ala Arg Phe Asn Ala Met Lys Asp Lys Arg Asn Ile Val Ser Leu Asn
595 600 605

Tyr Ala Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr Arg Leu
610 615 620

Ala Arg Leu Asn Glu Arg Phe Lys Arg Glu Gly Lys Pro Glu Leu Lys
625 630 635 640

Lys Leu Asp Asp Leu Pro Lys Asp Tyr Gln Glu Pro Asp Pro Tyr Leu
645 650 655

Asp Glu Thr Val Asn Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Lys Ala
660 665 670

Arg Pro Ala Glu Gln Pro Ala Pro Val Lys
675 680

<210> 27

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<300>

<308> Secuencia de Referencia NCBI / AP_003452

10 <309> 21-06-2011

<313> (1)..(236)

<400> 27

Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
1 5 10 15

Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
20 25 30

15 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
35 40 45

ES 2 659 155 T3

Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys
 225 230 235

<210> 28
 <211> 2048
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> gen Tsp knockout mutado

<400> 28

atgaattcgt ttttaggctt accgcgtag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat	60
taattgtaga agatatacag cgtgctgac aaattccggt attaaaggaa gagacgcagc	120
atgcgacggt aagtgagcgc gtaacgtcgc gcttcaccgg ttctcattat cgccagttcg	180

ES 2 659 155 T3

```

acctcgatca ggcattttcg gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctcgattaca      240
gccacaacgt gctgctggca agcgatgttg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag      300
gcgatgaact gcgttcaggc aaactcgacg ttttctacga tctctacaat ctggcgcaaa      360
agcgccgttt tgagcgttac cagtacgctt tgtcggctact ggaaaagccg atggatttca      420
ccggcaacga cacttataac cttgaccgca gcaaagcgcg ctggccgaaa aacgaggctg      480
agttgaacgc gctgtgggac agtaaagtca aattcgacga gttaagcctg aagctgacag      540
gaaaaacgga taaagaaatt cgtgaaaccc tgactcgcg ctacaaattt gccattcgtc      600
gtctggcgca aaccaacagc gaagatgttt tctcgcctggc aatgacggcg tttgcgcgtg      660
aatcgaccc gcataccaac tatctttccc cgcgtaatac cgaacagttc aacctgaaa      720
tgagtttgct gctggaaggt attggcgagc tgctgcaaat ggatgatgac tacaccgta      780
tcaattcgat ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca      840
aaattgtcgg tgttggtcaa acaggcaagc cgatggttga cgtgattggc tggcgtcttg      900
atgatgtggt tgccttaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaaattttac      960
ctgctggtaa agggaccaag acccgactg taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctcg     1020
aagaccgcbc ggttaaaatg tccgtgaaga ccgctcgtaa agagaaagtc ggcgtgctgg     1080
atattccggg cttctatgtg ggtttgacag acgatgtcaa agtgcaactg cagaaactgg     1140
aaaaacagaa tgtcagcagc gtcacatcgc acctgcgtag caatggcggg gggcggttaa     1200
ctgaagccgt atcgcctccc ggtctgttta ttcctgcggg tcccattggt caggtccgcb     1260
ataacaacgg caaggttcgt gaagatagcg ataccgacgg acaggttttc tataaaggcc     1320
cgctggtggt gctggttgac cgcttcagtg cttcggcttc agaaatcttt gcccgcgcaa     1380
tgcaggatta cggtcgtgcb ctggttggtg gtgaaccgac gtttggtaaa ggcaccgttc     1440
agcaataccg ttcattgaac cgtatttacg atcagatggt acgtcctgaa tggccagcgc     1500
tgggttctgt gcagtacagc atccagaaat tctatcgcgt taacggcggc agtacgcaac     1560
gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg     1620
agaaattcga agataacgcb ctgcccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat     1680
caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcb cgtatcgcga     1740
aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcb cttcaacgct atgaaggaca     1800
agcgcataat cgtttctctg aattacgctg tgcgtgagaa agagaataat gaagatgatg     1860
cgacgcgtct ggcgcgtttg aacgaacgct ttaaacgcbg aggtaaaccg gagttgaaga     1920
aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacgggtg     1980
atatcgactc cgatctggcg aagcttgaaa aagccagacc cgcggaacaa cccgctcccg     2040
tcaagtaa

```

```

<210> 29
<211> 1425
5 <212> ADN
  <213> Escherichia coli

```

```

10 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(1425)

```

```

<400> 29

```

ES 2 659 155 T3

atg Met 1	aaa Lys	aaa Lys	acc Thr	aca Thr 5	tta Leu	gca Ala	ctg Leu	agt Ser	gca Ala 10	ctg Leu	gct Ala	ctg Leu	agt Ser	tta Leu 15	ggt Gly	48
ttg Leu	gcg Ala	tta Leu	tct Ser 20	ccg Pro	ctc Leu	tct Ser	gca Ala 25	acg Thr	gcg Ala	gct Ala	gag Glu	act Thr	tct Ser 30	tca Ser	gca Ala	96
acg Thr	aca Thr	gcc Ala 35	cag Gln	cag Gln	atg Met	cca Pro	agc Ser 40	ctt Leu	gca Ala	ccg Pro	atg Met	ctc Leu 45	gaa Glu	aag Lys	gtg Val	144
atg Met 50	cct Pro	tca Ser	gtg Val	gtc Val	agc Ser	att Ile 55	aac Asn	gta Val	gaa Glu	ggt Gly	agc Ser 60	aca Thr	acc Thr	gtt Val	aat Asn	192
acg Thr 65	ccg Pro	cgt Arg	atg Met	ccg Pro	cgt Arg 70	aat Asn	ttc Phe	cag Gln	cag Gln	ttc Phe 75	ttc Phe	ggt Gly	gat Asp	gat Asp	tct Ser 80	240
ccg Pro	ttc Phe	tgc Cys	cag Gln	gaa Glu 85	ggt Gly	tct Ser	ccg Pro	ttc Phe	cag Gln 90	agc Ser	tct Ser	ccg Pro	ttc Phe	tgc Cys 95	cag Gln	288
ggt Gly	ggc Gly	cag Gln	ggc Gly 100	ggt Gly	aat Asn	ggt Gly	ggc Gly 105	ggc Gly	cag Gln	caa Gln	cag Gln	aaa Lys	ttc Phe 110	atg Met	gcg Ala	336
ctg Leu	ggt Gly	tcc Ser 115	ggc Gly	gtc Val	atc Ile	att Ile	gat Asp 120	gcc Ala	gat Asp	aaa Lys	ggc Gly	tat Tyr 125	gtc Val	gtc Val	acc Thr	384
aac Asn 130	aac Asn	cac His	ggt Val	ggt Val	gat Asp	aac Asn 135	gcg Ala	acg Thr	gtc Val	att Ile	aaa Lys 140	ggt Val	caa Gln	ctg Leu	agc Ser	432
gat Asp 145	ggc Gly	cgt Arg	aag Lys	ttc Phe	gac Asp 150	gcg Ala	aag Lys	atg Met	ggt Val	ggc Gly 155	aaa Lys	gat Asp	ccg Pro	cgc Arg	tct Ser 160	480
gat Asp	atc Ile	gcg Ala	ctg Leu	atc Ile 165	caa Gln	atc Ile	cag Gln	aac Asn	ccg Pro 170	aaa Lys	aac Asn	ctg Leu	acc Thr	gca Ala 175	att Ile	528
aag Lys	atg Met	gcg Ala	gat Asp 180	tct Ser	gat Asp	gca Ala	ctg Leu	cgc Arg 185	gtg Val	ggt Gly	gat Asp	tac Tyr	acc Thr 190	gta Val	gcg Ala	576
att Ile	ggt Gly	aac Asn	ccg Pro	ttt Phe	ggt Gly	ctg Leu	ggc Gly	gag Glu	acg Thr	gta Val	act Thr	tcc Ser	ggg Gly	att Ile	gtc Val	624

ES 2 659 155 T3

	195		200		205													
	tct	gcg	ctg	ggg	cgt	agc	ggc	ctg	aat	gcc	gaa	aac	tac	gaa	aac	ttc	672	
	Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Phe		
		210					215					220						
	atc	cag	acc	gat	gca	gcg	atc	aac	cgt	ggt	aac	tcc	ggt	ggt	gcg	ctg	720	
	Ile	Gln	Thr	Asp	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu		
						230					235					240		
	ggt	aac	ctg	aac	ggc	gaa	ctg	atc	ggt	atc	aac	acc	gcg	atc	ctc	gca	768	
	Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala		
					245					250					255			
	ccg	gac	ggc	ggc	aac	atc	ggt	atc	ggt	ttt	gct	atc	ccg	agt	aac	atg	816	
	Pro	Asp	Gly	Gly	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ser	Asn	Met		
				260					265					270				
	gtg	aaa	aac	ctg	acc	tcg	cag	atg	gtg	gaa	tac	ggc	cag	gtg	aaa	cgc	864	
	Val	Lys	Asn	Leu	Thr	Ser	Gln	Met	Val	Glu	Tyr	Gly	Gln	Val	Lys	Arg		
				275				280					285					
	ggt	gag	ctg	ggt	att	atg	ggg	act	gag	ctg	aac	tcc	gaa	ctg	gcg	aaa	912	
	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	Met	Gly	Thr	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys		
		290					295					300						
	gcg	atg	aaa	ggt	gac	gcc	cag	cgc	ggt	gct	ttc	gta	agc	cag	ggt	ctg	960	
	Ala	Met	Lys	Val	Asp	Ala	Gln	Arg	Gly	Ala	Phe	Val	Ser	Gln	Val	Leu		
		305				310					315					320		
	cct	aat	tcc	tcc	gct	gca	aaa	gcg	ggc	att	aaa	gcg	ggt	gat	gtg	atc	1008	
	Pro	Asn	Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Gly	Asp	Val	Ile		
					325					330					335			
	acc	tca	ctg	aac	ggt	aag	ccg	atc	agc	agc	ttt	gcc	gca	ctg	cgt	gct	1056	
	Thr	Ser	Leu	Asn	Gly	Lys	Pro	Ile	Ser	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala		
				340					345					350				
	cag	gtg	ggt	act	atg	ccg	gta	ggc	agc	aaa	ctg	acc	ctg	ggc	tta	ctg	1104	
	Gln	Val	Gly	Thr	Met	Pro	Val	Gly	Ser	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu		
			355				360						365					
	cgc	gac	ggt	aag	cag	ggt	aac	gtg	aac	ctg	gaa	ctg	cag	cag	agc	agc	1152	
	Arg	Asp	Gly	Lys	Gln	Val	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	Leu	Gln	Gln	Ser	Ser		
		370					375					380						
	cag	aat	cag	ggt	gat	tcc	agc	tcc	atc	ttc	aac	ggc	att	gaa	ggc	gct	1200	
	Gln	Asn	Gln	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Ile	Phe	Asn	Gly	Ile	Glu	Gly	Ala		
						390					395					400		
	gag	atg	agc	aac	aaa	ggc	aaa	gat	cag	ggc	gtg	gta	gtg	aac	aac	gtg	1248	
	Glu	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Lys	Asp	Gln	Gly	Val	Val	Val	Asn	Asn	Val		
				405						410					415			
	aaa	acg	ggc	act	ccg	gct	gcg	cag	atc	ggc	ctg	aag	aaa	ggt	gat	gtg	1296	
	Lys	Thr	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Gln	Ile	Gly	Leu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val		
				420					425					430				
	att	att	ggc	gcg	aac	cag	cag	gca	gtg	aaa	aac	atc	gct	gaa	ctg	cgt	1344	
	Ile	Ile	Gly	Ala	Asn	Gln	Gln	Ala	Val	Lys	Asn	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg		
			435					440					445					
	aaa	ggt	ctc	gac	agc	aaa	ccg	tct	gtg	ctg	gca	ctc	aac	att	cag	cgc	1392	
	Lys	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ile	Gln	Arg		
		450					455					460						
	ggc	gac	agc	acc	atc	tac	ctg	tta	atg	cag	taa	1425						
	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Tyr	Leu	Leu	Met	Gln								
		465				470												

- 5 <210> 30
- <211> 474
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

- 10 <400> 30

ES 2 659 155 T3

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala
 20 25 30

Thr Thr Ala Gln Gln Met Pro Ser Leu Ala Pro Met Leu Glu Lys Val
 35 40 45

Met Pro Ser Val Val Ser Ile Asn Val Glu Gly Ser Thr Thr Val Asn
 50 55 60

Thr Pro Arg Met Pro Arg Asn Phe Gln Gln Phe Phe Gly Asp Asp Ser
 65 70 75 80

Pro Phe Cys Gln Glu Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Phe Cys Gln
 85 90 95

Gly Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gln Gln Gln Lys Phe Met Ala
 100 105 110

Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile Asp Ala Asp Lys Gly Tyr Val Val Thr
 115 120 125

Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser
 130 135 140

Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
 165 170 175

Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
 180 185 190

ES 2 659 155 T3

Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
 195 200 205

Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
 210 215 220

Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240

Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
 245 250 255

Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
 260 265 270

Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg
 275 280 285

Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
 290 295 300

Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
 305 310 315 320

Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
 325 330 335

Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
 340 345 350

Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
 355 360 365

Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
 370 375 380

Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala
 385 390 395 400

Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val
 405 410 415

Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val
 420 425 430

Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg
 435 440 445

Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg
 450 455 460

Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln
 465 470

- 5 <210> 31
- <211> 1425
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> gen DegP mutado que comprende la mutación S210A y un marcador de restricción Ase I
- <220>
- <221> CDS

ES 2 659 155 T3

<222> (1)..(1425)

<400> 31

atg	aaa	aaa	acc	aca	tta	gca	ctg	agt	gca	ctg	gct	ctg	agt	tta	ggt	48
Met	Lys	Lys	Thr	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	
1				5					10					15		
ttg	gcg	tta	tct	ccg	ctc	tct	gca	acg	gcg	gct	gag	act	tct	tca	gca	96
Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Thr	Ser	Ser	Ala	
			20					25					30			
acg	aca	gcc	cag	cag	atg	cca	agc	ctt	gca	ccg	atg	ctc	gaa	aag	gtg	144
Thr	Thr	Ala	Gln	Gln	Met	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Lys	Val	
		35					40					45				
atg	cct	tca	gtg	gtc	agc	att	aac	gta	gaa	ggt	agc	aca	acc	ggt	aat	192
Met	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asn	
	50					55					60					
acg	ccg	cgt	atg	ccg	cgt	aat	ttc	cag	cag	ttc	ttc	ggt	gat	gat	tct	240
Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Arg	Asn	Phe	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Asp	Ser	
	65				70					75					80	
ccg	ttc	tgc	cag	gaa	ggt	tct	ccg	ttc	cag	agc	tct	ccg	ttc	tgc	cag	288
Pro	Phe	Cys	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Ser	Ser	Pro	Phe	Cys	Gln	
			85					90						95		
ggt	ggc	cag	ggc	ggt	aat	ggt	ggc	ggc	cag	caa	cag	aaa	ttc	atg	gcg	336
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Ala	
			100				105						110			
ctg	ggt	tcc	ggc	gtc	atc	att	gat	gcc	gat	aaa	ggc	tat	gtc	gtc	acc	384
Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	
		115					120					125				
aac	aac	cac	ggt	ggt	gat	aac	gcg	acg	gtc	att	aaa	ggt	caa	ctg	agc	432
Asn	Asn	His	Val	Val	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	
	130					135					140					
gat	ggc	cgt	aag	ttc	gac	gcg	aag	atg	ggt	ggc	aaa	gat	ccg	cgc	tct	480
Asp	Gly	Arg	Lys	Phe	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Arg	Ser	
	145				150					155					160	

5

ES 2 659 155 T3

gat atc gcg ctg atc caa atc cag aac ccg aaa aac ctg acc gca att 528
 Asp Ile Ala Leu Ile Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
 165 170 175

aag atg gcg gat tct gat gca ctg cgc gtg ggt gat tac acc gta gcg 576
 Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
 180 185 190

att ggt aac ccg ttt ggt ctg ggc gag acg gta act tcc ggg att gtc 624
 Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
 195 200 205

tct gcg ctg ggg cgt agc ggc ctg aat gcc gaa aac tac gaa aac ttc 672
 Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
 210 215 220

atc cag acc gat gca gcg att aat cgt ggt aac gcc ggt ggt gcg ctg 720
 Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ala Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240

gtt aac ctg aac ggc gaa ctg atc ggt atc aac acc gcg atc ctc gca 768
 Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
 245 250 255

ccg gac ggc ggc aac atc ggt atc ggt ttt gct atc ccg agt aac atg 816
 Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
 260 265 270

gtg aaa aac ctg acc tcg cag atg gtg gaa tac ggc cag gtg aaa cgc 864
 Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg
 275 280 285

ggt gag ctg ggt att atg ggg act gag ctg aac tcc gaa ctg gcg aaa 912
 Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
 290 295 300

gcg atg aaa gtt gac gcc cag cgc ggt gct ttc gta agc cag gtt ctg 960
 Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
 305 310 315 320

cct aat tcc tcc gct gca aaa gcg ggc att aaa gcg ggt gat gtg atc 1008
 Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
 325 330 335

acc tca ctg aac ggt aag ccg atc agc agc ttt gcc gca ctg cgt gct 1056
 Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
 340 345 350

cag gtg ggt act atg ccg gta ggc agc aaa ctg acc ctg ggc tta ctg 1104
 Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
 355 360 365

cgc gac ggt aag cag gtt aac gtg aac ctg gaa ctg cag cag agc agc 1152
 Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
 370 375 380

cag aat cag gtt gat tcc agc tcc atc ttc aac ggc att gaa ggc gct 1200
 Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala
 385 390 395 400

gag atg agc aac aaa ggc aaa gat cag ggc gtg gta gtg aac aac gtg 1248
 Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val
 405 410 415

aaa acg ggc act ccg gct gcg cag atc ggc ctg aag aaa ggt gat gtg 1296
 Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val
 420 425 430

att att ggc gcg aac cag cag gca gtg aaa aac atc gct gaa ctg cgt 1344
 Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg
 435 440 445

aaa gtt ctc gac agc aaa ccg tct gtg ctg gca ctc aac att cag cgc 1392
 Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg
 450 455 460

ggc gac agc acc atc tac ctg tta atg cag taa 1425
 Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln
 465 470

<210> 32
 <211> 474

ES 2 659 155 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Construcción sintética

<400> 32

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala
 20 25 30
 Thr Thr Ala Gln Gln Met Pro Ser Leu Ala Pro Met Leu Glu Lys Val
 35 40 45
 Met Pro Ser Val Val Ser Ile Asn Val Glu Gly Ser Thr Thr Val Asn
 50 55 60
 Thr Pro Arg Met Pro Arg Asn Phe Gln Gln Phe Phe Gly Asp Asp Ser
 65 70 75 80
 Pro Phe Cys Gln Glu Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Phe Cys Gln
 85 90 95
 Gly Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gln Gln Gln Lys Phe Met Ala
 100 105 110
 Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile Asp Ala Asp Lys Gly Tyr Val Val Thr
 115 120 125
 Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser
 130 135 140

10

ES 2 659 155 T3

Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
 165 170 175
 Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
 180 185 190
 Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
 195 200 205
 Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
 210 215 220
 Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ala Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
 245 250 255
 Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
 260 265 270
 Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg
 275 280 285
 Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
 290 295 300
 Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
 305 310 315 320
 Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
 325 330 335
 Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
 340 345 350
 Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
 355 360 365
 Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
 370 375 380
 Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala

ES 2 659 155 T3

385		390		395		400
Glu Met Ser Asn	Lys Gly Lys Asp Gln	Gly Val Val Val	Asn Asn Val			
	405		410		415	
Lys Thr Gly Thr	Pro Ala Ala Gln	Ile Gly Leu Lys Lys	Gly Asp Val			
	420		425		430	
Ile Ile Gly Ala	Asn Gln Gln Ala	Val Lys Asn Ile	Ala Glu Leu Arg			
	435		440		445	
Lys Val Leu Asp	Ser Lys Pro Ser	Val Leu Ala Leu	Asn Ile Gln Arg			
	450		455		460	
Gly Asp Ser Thr	Ile Tyr Leu Leu	Met Gln				
	465		470			

5 <210> 33
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> IGS cassette-1
 <400> 33

gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggagagtgt taatgaagaa gactgctata 60
 gcaattg 67

15 <210> 34
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> IGS cassette-2
 <400> 34

gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt taaatgaag aagactgcta 60
 tagcaattg 69

30 <210> 35
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> IGS cassette-3

35 <400> 35

gagctcacca gtaacaaaaa gctttaatag aggagagtgt tgaggaggaa aaaaaaatga 60
 agaaaactgc tatagcaatt g 81

40 <210> 36
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> IGS cassette-4

ES 2 659 155 T3

<400> 36
gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggagagtgt tgacgaggat tatataatga 60
agaaaactgc tatagcaatt g 81

5
<210> 37
<211> 954
<212> ADN
<213> Escherichia coli

10
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(954)

15 <400> 37
atg cgg gcg aaa ctt ctg gga ata gtc ctg aca acc cct att gcg atc 48
Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
1 5 10 15
agc tct ttt gct tct acc gag act tta tcg ttt act cct gac aac ata 96
Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
20 25 30
aat gcg gac att agt ctt gga act ctg agc gga aaa aca aaa gag cgt 144
Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
35 40 45
gtt tat cta gcc gaa gaa gga ggc cga aaa gtc agt caa ctc gac tgg 192
Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
50 55 60
aaa ttc aat aac gct gca att att aaa ggt gca att aat tgg gat ttg 240
Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
65 70 75 80
atg ccc cag ata tct atc ggg gct gct ggc tgg aca act ctc ggc agc 288
Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
85 90 95
cga ggt ggc aat atg gtc gat cag gac tgg atg gat tcc agt aac ccc 336
Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
100 105 110
gga acc tgg acg gat gaa agt aga cac cct gat aca caa ctc aat tat 384
Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
115 120 125
gcc aac gaa ttt gat ctg aat atc aaa ggc tgg ctc ctc aac gaa ccc 432
Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
130 135 140

ES 2 659 155 T3

aat tac cgc ctg gga ctc atg gcc gga tat cag gaa agc cgt tat agc 480
 Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
 145 150 155 160
 ttt aca gcc aga ggt ggt tcc tat atc tac agt tct gag gag gga ttc 528
 Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
 165 170 175
 aga gat gat atc ggc tcc ttc ccg aat gga gaa aga gca atc ggc tac 576
 Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
 180 185 190
 aaa caa cgt ttt aaa atg ccc tac att ggc ttg act gga agt tat cgt 624
 Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
 195 200 205
 tat gaa gat ttt gaa ctc ggt ggc aca ttt aaa tac agc ggc tgg gtg 672
 Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
 210 215 220
 gaa tca tct gat aac gat gaa cac tat gac ccg gga aaa aga atc act 720
 Glu Ser Ser Asp Asn Asp Glu His Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
 225 230 235 240
 tat cgc agt aag gtc aaa gac caa aat tac tat tct gtt gca gtc aat 768
 Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
 245 250 255
 gca ggt tat tac gtc aca cct aac gca aaa gtt tat gtt gaa ggc gca 816
 Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
 260 265 270
 tgg aat cgg gtt acg aat aaa aaa ggt aat act tca ctt tat gat cac 864
 Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
 275 280 285
 aat aat aac act tca gac tac agc aaa aat gga gca ggt ata gaa aac 912
 Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
 290 295 300
 tat aac ttc atc act act gct ggt ctt aag tac aca ttt taa 954
 Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
 305 310 315

<210> 38
 <211> 317
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 38

Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
 20 25 30
 10 Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
 35 40 45

ES 2 659 155 T3

Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
 50 60
 Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
 65 70 75 80
 Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
 85 90 95
 Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
 100 105 110
 Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
 115 120 125
 Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
 130 135 140
 Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
 145 150 155 160
 Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
 165 170 175
 Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
 180 185 190
 Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
 195 200 205
 Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
 210 215 220
 Glu Ser Ser Asp Asn Asp Glu His Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
 225 230 235 240
 Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
 245 250 255
 Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
 260 265 270
 Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
 275 280 285
 Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
 305 310 315

- 5 <210> 39
- <211> 954
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> gen OmpT mutante knock-out
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (1)..(954)
- <400> 39

ES 2 659 155 T3

att cgg gcg aaa ctt ctg gga ata gtc ctg aca acc cct att gcg atc 48
 Ile Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15

agc tct ttt gct tct acc gag act tta tcg ttt act cct gac aac ata 96
 Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
 20 25 30

aat gcg gac att agt ctt gga act ctg agc gga aaa aca aaa gag cgt 144
 Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
 35 40 45

gtt tat cta gcc gaa gaa gga ggc cga aaa gtc agt caa ctc gac tgg 192
 Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
 50 55 60

aaa ttc aat aac gct gca att att aaa ggt gca att aat tgg gat ttg 240
 Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
 65 70 75 80

atg ccc cag ata tct atc ggg gct gct ggc tgg aca act ctc ggc agc 288
 Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Trp Thr Thr Leu Gly Ser
 85 90 95

cga ggt ggc aat atg gtc gat cag gac tgg atg gat tcc agt aac ccc 336
 Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
 100 105 110

gga acc tgg acg gat gaa agt aga cac cct gat aca caa ctc aat tat 384
 Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
 115 120 125

gcc aac gaa ttt gat ctg aat atc aaa ggc tgg ctc ctc aac gaa ccc 432
 Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
 130 135 140

aat tac cgc ctg gga ctc atg gcc gga tat cag gaa agc cgt tat agc 480
 Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
 145 150 155 160

ttt aca gcc aga ggt ggt tcc tat atc tac agt tct gag gag gga ttc 528
 Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
 165 170 175

aga gat gat atc ggc tcc ttc ccg aat gga gaa aga gca atc ggc tac 576
 Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
 180 185 190

aaa caa cgt ttt aaa atg ccc tac att ggc ttg act gga agt tat cgt 624
 Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
 195 200 205

tat gaa gat ttt gaa ctc ggt ggc aca ttt aaa tac agc ggc tgg gtg 672
 Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
 210 215 220

gaa tca tct gat aac gat gaa cac tat gac ccg gga aaa aga atc act 720
 Glu Ser Ser Asp Asn Asp Glu His Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
 225 230 235 240

tat cgc agt aag gtc aaa gac caa aat tac tat tct gtt gca gtc aat 768
 Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
 245 250 255

gca ggt tat tac gtc aca cct aac gca aaa gtt tat gtt gaa ggc gca 816
 Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
 260 265 270

tgg aat cgg gtt acg aat aaa aaa ggt aat act tca ctt tat gat cac 864
 Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
 275 280 285

aat aat aac act tca gac tac agc aaa aat gga gca ggt ata gaa aac 912
 Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
 290 295 300

tat aac ttc atc act act gct ggt ctt aag tac aca ttt taa 954
 Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
 305 310 315

ES 2 659 155 T3

<211> 317
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 40

Ile Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
1 5 10 15

Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
20 25 30

Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
35 40 45

10 Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
50 55 60

ES 2 659 155 T3

Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
65 70 75 80

Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
85 90 95

Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
100 105 110

Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
115 120 125

Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
130 135 140

Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
145 150 155 160

Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
165 170 175

Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
180 185 190

Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
195 200 205

Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
210 215 220

Glu Ser Ser Asp Asn Asp Glu His Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
245 250 255

Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
260 265 270

Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
275 280 285

Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
290 295 300

Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
305 310 315

<210> 41

<211> 954

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> gen ompT mutado que codifica la proteína con las mutaciones puntuales D210A y H212A

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(954)

15 <400> 41

ES 2 659 155 T3

atg cgg gcg aaa ctt ctg gga ata gtc ctg aca acc cct att gcg atc 48
Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
1 5 10 15

agc tct ttt gct tct acc gag act tta tcg ttt act cct gac aac ata 96
Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
20 25 30

aat gcg gac att agt ctt gga act ctg agc gga aaa aca aaa gag cgt 144
Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr 40 Leu Ser Gly Lys Thr 45 Glu Arg

gtt tat cta gcc gaa gaa gga ggc cga aaa gtc agt caa ctc gac tgg 192
Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
50 55 60

aaa ttc aat aac gct gca att att aaa ggt gca att aat tgg gat ttg 240
Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
65 70 75 80

atg ccc cag ata tct atc ggg gct gct ggc tgg aca act ctc ggc agc 288
Met Pro Gln Ile Ser Ile Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
85 90 95

cga ggt ggc aat atg gtc gat cag gac tgg atg gat tcc agt aac ccc 336
Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
100 105 110

gga acc tgg acg gat gaa agt aga cac cct gat aca caa ctc aat tat 384
Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
115 120 125

gcc aac gaa ttt gat ctg aat atc aaa ggc tgg ctc ctc aac gaa ccc 432
Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
130 135 140

aat tac cgc ctg gga ctc atg gcc gga tat cag gaa agc cgt tat agc 480
Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
145 150 155 160

ttt aca gcc aga ggt ggt tcc tat atc tac agt tct gag gag gga ttc 528
Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
165 170 175

aga gat gat atc ggc tcc ttc ccg aat gga gaa aga gca atc ggc tac 576
Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
180 185 190

aaa caa cgt ttt aaa atg ccc tac att ggc ttg act gga agt tat cgt 624
Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
195 200 205

tat gaa gat ttt gaa ctc ggt ggc aca ttt aaa tac agc ggc tgg gtg 672
Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr 220 Ser Gly Trp Val
210 215 220

gaa tca tct gat aac gct gaa gct tat gac ccg gga aaa aga atc act 720
Glu Ser Ser Asp Asn Ala Glu Ala Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
225 230 235 240

tat cgc agt aag gtc aaa gac caa aat tac tat tct gtt gca gtc aat 768
Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
245 250 255

gca ggt tat tac gtc aca cct aac gca aaa gtt tat gtt gaa ggc gca 816
Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
260 265 270

tgg aat cgg gtt acg aat aaa aaa ggt aat act tca ctt tat gat cac 864
Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys 280 Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
275 285

aat aat aac act tca gac tac agc aaa aat gga gca ggt ata gaa aac 912
Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
290 295 300

tat aac ttc atc act act gct ggt ctt aag tac aca ttt taa 954
Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
305 310 315

<210> 42
<211> 317

5

ES 2 659 155 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Construcción sintética

<400> 42

Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
1 5 10 15
Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
20 25 30
Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
35 40 45
Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
50 55 60
Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
65 70 75 80

10

ES 2 659 155 T3

Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
85 90 95

Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
100 105 110

Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
115 120 125

Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
130 135 140

Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
145 150 155 160

Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
165 170 175

Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
180 185 190

Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
195 200 205

Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
210 215 220

Glu Ser Ser Asp Asn Ala Glu Ala Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
245 250 255

Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
260 265 270

Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
275 280 285

Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
290 295 300

Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
305 310 315

<210> 43
<211> 711
5 <212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(711)

<400> 43

ES 2 659 155 T3

atg aag aaa ggt ttt atg ttg ttt act ttg tta gcg gcg ttt tca ggc 48
 Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15

ttt gct cag gct gat gac gcg gca att caa caa acg tta gcc aaa atg 96
 Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30

ggc atc aaa agc agc gat att cag gcc gcg cct gta gct ggc atg aag 144
 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45

aca gtt ctg act aac agc ggc gtg ttg tac atc acc gat gat ggt aaa 192
 Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60

cat atc att cag ggg cca atg tat gac gtt agt ggc acg gct ccg gtc 240
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80

aat gtc acc aat aag atg ctg tta aag cag ttg aat gcg ctt gaa aaa 288
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95

gag atg atc gtt tat aaa gcg ccg cag gaa aaa cac gtc atc acc gtg 336
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110

ttt act gat att acc tgt ggt tac tgc cac aaa ctg cat gag caa atg 384
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125

gca gac tac aac gcg ctg ggg atc acc gtg cgt tat ctt gct ttc ccg 432
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140

cgc cag ggg ctg gac agc gat gca gag aaa gaa atg aaa gct atc tgg 480
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160

tgt gcg aaa gat aaa aac aaa gcg ttt gat gat gtg atg gca ggt aaa 528
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175

agc gtc gca cca gcc agt tgc gac gtg gat att gcc gac cat tac gca 576
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190

ctt ggc gtc cag ctt ggc gtt agc ggt act ccg gca gtt gtg ctg agc 624
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205

aat ggc aca ctt gtt ccg ggt tac cag ccg ccg aaa gag atg aaa gaa 672

Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220

ttt ctc gac gaa cac caa aaa atg acc agc ggt aaa taa 711
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys
 225 230 235

5 <210> 44
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 44

ES 2 659 155 T3

Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys
 225 230 235

- 5 <210> 45
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> DsbC que comprende his-tag y que carece de un sitio de restricción EcoRI
 <220>
 <221> CDS
- 15 <222> (1)..(729)
 <400> 45

ES 2 659 155 T3

atg aag aaa ggt ttt atg ttg ttt act ttg tta gcg gcg ttt tca ggc 48
Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
1 5 10 15

ttt gct cag gct gat gac gcg gca att caa caa acg tta gcc aaa atg 96
Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
20 25 30

ggc atc aaa agc agc gat att cag ccc gcg cct gta gct gcc atg aag 144
Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
35 40 45

aca gtt ctg act aac agc ggc gtg ttg tac atc acc gat gat ggt aaa 192
Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
50 55 60

cat atc att cag ggg cca atg tat gac gtt agt gcc acg gct ccg gtc 240
His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
65 70 75 80

aat gtc acc aat aag atg ctg tta aag cag ttg aat gcg ctt gaa aaa 288
Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
85 90 95

gag atg atc gtt tat aaa gcg ccg cag gaa aaa cac gtc atc acc gtg 336
Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
100 105 110

ttt act gat att acc tgt ggt tac tgc cac aaa ctg cat gag caa atg 384
Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
115 120 125

gca gac tac aac gcg ctg ggg atc acc gtg cgt tat ctt gct ttc ccg 432
Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
130 135 140

cgc cag ggg ctg gac agc gat gca gag aaa gaa atg aaa gct atc tgg 480

Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp 160
145 150 155

tgt gcg aaa gat aaa aac aaa gcg ttt gat gat gtg atg gca ggt aaa 528
Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
165 170 175

agc gtc gca cca gcc agt tgc gac gtg gat att gcc gac cat tac gca 576
Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
180 185 190

ctt ggc gtc cag ctt ggc gtt agc ggt act ccg gca gtt gtg ctg agc 624
Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
195 200 205

aat ggc aca ctt gtt ccg ggt tac cag ccg ccg aaa gag atg aaa gaa 672
Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
210 215 220

ttt ctc gac gaa cac caa aaa atg acc agc ggt aaa cac cat cac cat 720
Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys His His His His
225 230 235 240

cac cac taa 729
His His

- 5 <210> 46
- <211> 242
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
- <400> 46

ES 2 659 155 T3

Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys His His His His
 225 230 235 240

His His

- 5 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador 6283 Tsp 3'
- <400> 47
- 15 gcatcataat tttctttta cctc 24
 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN

ES 2 659 155 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Primer 6283 Tsp 5'

5 <400> 48

gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

10 <210> 49
<211> 3120
<212> ADN
<213> Escherichia coli

15 <220>
<221> CDS
<222> (206)..(3091)
<223> preproteasa III (AA -23 a 939)

20 <220>
<221> peptido_señal
<222> (206)..(274)

25 <220>
<221> péptido_mat
<222> (275)..(3091)
<223> proteasa III (AA 1 - 939)

30 <300>
<308> GenBank / X06227
<309> 18-04-2005
<313> (1)..(3120)

35 <400> 49

ttaccgctgt ttcgctttaa tcagtcatga gtgctgtata aaaattgctc aatctatccg 60

cttactttat gatgcgcacc agtcacggac tgatggttat ataacatag gctgactcct 120

gcagcacaag attaaattct ggcagatgat ttgcgtaa acgtgtgaatc tggacagaaa 180

attaagttga ttatgaggtc cgtga atg ccc cgc agc acc tgg ttc aaa gca 232
Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala
-20 -15

tta ttg ttg tta gtt gcc ctt tgg gca ccc tta agt cag gca gaa acg 280
Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu Trp Ala Pro Leu Ser Gln Ala Glu Thr
-10 -5 -1 1

gga tgg cag ccg att cag gaa acc atc cgt aaa agt gat aaa gat aac 328
Gly Trp Gln Pro Ile Gln Glu Thr Ile Arg Lys Ser Asp Lys Asp Asn
5 10 15

cgc cag tat cag gct ata cgt ctg gat aac ggt atg gtg gtc ttg ctg 376
Arg Gln Tyr Gln Ala Ile Arg Leu Asp Asn Gly Met Val Val Leu Leu
20 25 30

gtt tct gat ccg cag gca gtt aaa tcg ctc tcg gcg ctg gtg gtg ccc 424
Val Ser Asp Pro Gln Ala Val Lys Ser Leu Ser Ala Leu Val Val Pro
35 40 45 50

gtt ggg tcg ctg gaa gat ccc gag gcg tac cag ggg ctg gca cat tac 472
Val Gly Ser Leu Glu Asp Pro Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Ala His Tyr
55 60 65

ctt gaa cat atg agt ctg atg ggg tcg aaa aag tac ccg cag gct gac 520
Leu Glu His Met Ser Leu Met Gly Ser Lys Lys Tyr Pro Gln Ala Asp
70 75 80

agt ctg gcc gaa tat ctc aaa atg cac ggc ggt agt cac aat gcc agc 568
Ser Leu Ala Glu Tyr Leu Lys Met His Gly Gly Ser His Asn Ala Ser
85 90 95

ES 2 659 155 T3

act	gcg	ccg	tat	cgc	acg	gct	ttc	tat	ctg	gaa	gtt	gag	aac	gac	gcc	616
Thr	Ala	Pro	Tyr	Arg	Thr	Ala	Phe	Tyr	Leu	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Ala	
	100					105					110					
ttg	cct	ggt	gcg	gta	gac	cgc	ctg	gcc	gat	gct	att	gct	gaa	cct	ttg	664
Leu	Pro	Gly	Ala	Val	Asp	Arg	Leu	Ala	Asp	Ala	Ile	Ala	Glu	Pro	Leu	
	115				120					125					130	
ctc	gac	aag	aaa	tat	gcc	gaa	cgt	gag	cgt	aat	gcg	gtg	aac	gct	gaa	712
Leu	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Asn	Ala	Val	Asn	Ala	Glu	
				135					140					145		
tta	acc	atg	gcg	cgt	acg	cgt	gac	ggg	atg	cgc	atg	gca	cag	gtc	agc	760
Leu	Thr	Met	Ala	Arg	Thr	Arg	Asp	Gly	Met	Arg	Met	Ala	Gln	Val	Ser	
			150					155					160			
gca	gaa	acc	att	aac	ccg	gca	cac	ccc	ggt	tca	aag	ttt	tct	ggt	ggt	808
Ala	Glu	Thr	Ile	Asn	Pro	Ala	His	Pro	Gly	Ser	Lys	Phe	Ser	Gly	Gly	
			165				170					175				
aac	ctc	gaa	act	tta	agc	gac	aaa	cct	ggt	aat	ccg	gtg	cag	cag	gcg	856
Asn	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Asn	Pro	Val	Gln	Gln	Ala	
	180					185					190					
ctg	aaa	gat	ttc	cac	gag	aag	tac	tat	tcc	gcc	aat	ttg	atg	aag	gcg	904
Leu	Lys	Asp	Phe	His	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Asn	Leu	Met	Lys	Ala	
	195				200					205					210	
gtt	att	tac	agt	aat	aaa	ccg	ctg	ccg	gag	ttg	gca	aaa	atg	gcg	gcg	952
Val	Ile	Tyr	Ser	Asn	Lys	Pro	Leu	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Ala	Ala	
				215					220					225		
gac	acc	ttt	ggt	cgc	gtg	ccg	aac	aaa	gag	agc	aaa	aaa	ccg	gaa	atc	1000
Asp	Thr	Phe	Gly	Arg	Val	Pro	Asn	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Glu	Ile	
			230					235					240			
acc	gtg	ccg	gta	gtc	acc	gac	gcg	caa	aag	ggc	att	atc	att	cat	tac	1048
Thr	Val	Pro	Val	Val	Thr	Asp	Ala	Gln	Lys	Gly	Ile	Ile	Ile	His	Tyr	
			245				250					255				
gtc	cct	gcg	ctg	ccg	cgt	aaa	gtg	ttg	cgc	gtt	gag	ttt	cgc	atc	gat	1096
Val	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Lys	Val	Leu	Arg	Val	Glu	Phe	Arg	Ile	Asp	
	260					265					270					
aac	aac	tca	gcg	aag	ttc	cgt	agt	aaa	acc	gat	gaa	ttg	att	acc	tat	1144
Asn	Asn	Ser	Ala	Lys	Phe	Arg	Ser	Lys	Thr	Asp	Glu	Leu	Ile	Thr	Tyr	
					280					285					290	
ctg	att	ggc	aat	cgc	agc	cca	ggt	aca	ctt	tct	gac	tgg	ctg	caa	aag	1192
Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Asp	Trp	Leu	Gln	Lys	
				295					300					305		
cag	gga	tta	ggt	gag	ggc	att	agc	gcc	aac	tcc	gat	cct	atc	gtc	aac	1240
Gln	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser	Asp	Pro	Ile	Val	Asn	
			310					315					320			
ggc	aac	agc	ggc	gta	tta	gcg	atc	tct	gcg	tct	tta	acc	gat	aaa	ggc	1288
Gly	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Ala	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Lys	Gly	
			325				330					335				
ctg	gct	aat	cgc	gat	cag	ggt	gtg	gcg	gca	att	ttt	agc	tat	ctc	aat	1336
Leu	Ala	Asn	Arg	Asp	Gln	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Phe	Ser	Tyr	Leu	Asn	

ES 2 659 155 T3

340					345					350						
ctg Leu 355	tta Leu	cgt Arg	gaa Glu	aaa Lys	ggc Gly 360	att Ile	gat Asp	aaa Lys	caa Gln	tac Tyr 365	ttc Phe	gat Asp	gaa Glu	ctg Leu	gcg Ala 370	1384
aat Asn	gtg Val	ctg Leu	gat Asp	atc Ile 375	gac Asp	ttc Phe	cgt Arg	tat Tyr	ccg Pro 380	tcg Ser	atc Ile	acc Thr	cgt Arg	gat Asp 385	atg Met	1432
gat Asp	tac Tyr	gtc Val	gaa Glu 390	tgg Trp	ctg Leu	gca Ala	gat Asp	acc Thr 395	atg Met	att Ile	cgc Arg	gtt Val	cct Pro 400	gtt Val	gag Glu	1480
cat His	acg Thr	ctg Leu 405	gat Asp	gca Ala	gtc Val	aat Asn	att Ile 410	gcc Ala	gat Asp	cgg Arg	tac Tyr	gat Asp 415	gct Ala	aaa Lys	gca Ala	1528
gta Val	aag Lys 420	gaa Glu	cgt Arg	ctg Leu	gcg Ala	atg Met 425	atg Met	acg Thr	ccg Pro	cag Gln	aat Asn 430	gcg Ala	cgt Arg	atc Ile	tgg Trp	1576
tat Tyr 435	atc Ile	agc Ser	ccg Pro	aaa Lys	gag Glu 440	ccg Pro	cac His	aac Asn	aaa Lys	acg Thr 445	gct Ala	tac Tyr	ttt Phe	gtc Val	gat Asp 450	1624
gcg Ala	ccg Pro	tat Tyr	cag Gln	gtc Val 455	gat Asp	aaa Lys	atc Ile	agc Ser	gca Ala 460	caa Gln	act Thr	ttc Phe	gcc Ala	gac Asp 465	tgg Trp	1672
cag Gln	aaa Lys	aaa Lys	gcc Ala 470	gcc Ala	gac Asp	att Ile	gcg Ala	ctc Leu 475	tct Ser	ttg Leu	cca Pro	gag Glu	ctt Leu 480	aac Asn	cct Pro	1720
tat Tyr	att Ile	cct Pro 485	gat Asp	gat Asp	ttc Phe	tcg Ser	ctg Leu 490	att Ile	aag Lys	tca Ser	gag Glu	aag Lys 495	aaa Lys	tac Tyr	gac Asp	1768
cat His	cca Pro 500	gag Glu	ctg Leu	att Ile	gtt Val	gat Asp 505	gag Glu	tcg Ser	aat Asn	ctg Leu	cgc Arg 510	gtg Val	gtg Val	tat Tyr	gcg Ala	1816
cca Pro 515	agc Ser	cgt Arg	tat Tyr	ttt Phe	gcc Ala 520	agc Ser	gag Glu	ccc Pro	aaa Lys	gct Ala 525	gat Asp	gtc Val	agc Ser	ctg Leu	att Ile 530	1864
ttg Leu	cgt Arg	aat Asn	ccg Pro	aaa Lys 535	gcc Ala	atg Met	gac Asp	agc Ser	gcc Ala 540	cgc Arg	aat Asn	cag Gln	gtg Val	atg Met 545	ttt Phe	1912
gcg Ala	ctc Leu	aat Asn	gat Asp 550	tat Tyr	ctc Leu	gca Ala	ggg Gly	ctg Leu 555	gcg Ala	ctt Leu	gat Asp	cag Gln	tta Leu 560	agc Ser	aac Asn	1960
cag Gln	gcg Ala	tcg Ser 565	gtt Val	ggt Gly	ggc Gly	ata Ile	agt Ser 570	ttt Phe	tcc Ser	acc Thr	aac Asn	gct Ala 575	aac Asn	aac Asn	ggc Gly	2008
ctt Leu	atg Met 580	gtt Val	aat Asn	gct Ala	aat Asn 585	ggt Gly	tac Tyr	acc Thr	cag Gln	cgt Arg	ctg Leu 590	ccg Pro	cag Gln	ctg Leu	ttc Phe	2056
cag Leu	gca Met	ttg Val	ctc Asn	gag Ala	ggg Gly	tac Ile	ttt Tyr	agc Thr	tat Gln	acc Arg	gct Leu 590	acg Pro	gaa Gln	gat Leu	cag Phe	2104

ES 2 659 155 T3

Gln 595	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly 600	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Thr 605	Ala	Thr	Glu	Asp	Gln 610	
ctt Leu	gag Glu	cag Gln	gcg Ala	aag Lys 615	tcc Ser	tgg Trp	tat Tyr	aac Asn	cag Gln 620	atg Met	atg Met	gat Asp	tcc Ser	gca Ala 625	gaa Glu	2152
aag Lys	ggt Gly	aaa Lys	gcg Ala 630	ttt Phe	gag Glu	cag Gln	gcg Ala	att Ile 635	atg Met	ccc Pro	gcg Ala	cag Gln	atg Met 640	ctc Leu	tcg Ser	2200
caa Gln	gtg Val	ccg Pro 645	tac Tyr	ttc Phe	tcg Ser	cga Arg	gat Asp 650	gaa Glu	cgg Arg	cgt Arg	aaa Lys	att Ile 655	ttg Leu	ccc Pro	tcc Ser	2248
att Ile	acg Thr 660	ttg Leu	aaa Lys	gag Glu	gtg Val 665	ctg Leu	gcc Ala	tat Tyr	cgc Arg	gac Asp	gcc Ala 670	tta Leu	aaa Lys	tca Ser	ggg Gly	2296
gct Ala 675	cga Arg	cca Pro	gag Glu	ttt Phe	atg Met 680	gtt Val	atc Ile	ggc Gly	aac Asn	atg Met 685	acc Thr	gag Glu	gcc Ala	cag Gln	gca Ala 690	2344
aca Thr	acg Thr	ctg Leu	gca Ala	cgc Arg 695	gat Asp	gtg Val	caa Gln	aaa Lys	cag Gln 700	ttg Leu	ggc Gly	gct Ala	gat Asp	ggt Gly 705	tca Ser	2392
gag Glu	tgg Trp	tgt Cys	cga Arg 710	aac Asn	aaa Lys	gat Asp	gta Val	gtg Val 715	gtc Val	gat Asp	aaa Lys	aaa Lys	caa Gln 720	tcc Ser	gtc Val	2440
atc Ile	ttt Phe	gaa Glu 725	aaa Lys	gcc Ala	ggt Gly	aac Asn	agc Ser 730	acc Thr	gac Asp	tcc Ser	gca Ala	ctg Leu 735	gca Ala	gcg Ala	gta Val	2488
ttt Phe	gta Val 740	ccg Pro	act Thr	ggc Gly	tac Tyr	gat Asp 745	gaa Glu	tac Tyr	acc Thr	agc Ser	tca Ser 750	gcc Ala	tat Tyr	agc Ser	tct Ser	2536
ctg Leu 755	ttg Leu	ggg Gly	cag Gln	atc Ile	gta Val 760	cag Gln	ccg Pro	tgg Trp	ttc Phe	tac Tyr 765	aat Asn	cag Gln	ttg Leu	cgt Arg	acc Thr 770	2584
gaa Glu	gaa Glu	caa Gln	ttg Leu	ggc Gly 775	tat Tyr	gcc Ala	gtg Val	ttt Phe	gcg Ala 780	ttt Phe	cca Pro	atg Met	agc Ser	gtg Val 785	ggg Gly	2632
cgt Arg	cag Gln	tgg Trp	ggc Gly 790	atg Met	ggc Gly	ttc Phe	ctt Leu	ttg Leu 795	caa Gln	agc Ser	aat Asn	gat Asp	aaa Lys 800	cag Gln	cct Pro	2680
tca Ser	ttc Phe	ttg Leu 805	tgg Trp	gag Glu	cgt Arg	tac Tyr	aag Lys 810	gcg Ala	ttt Phe	ttc Phe	cca Pro	acc Thr 815	gca Ala	gag Glu	gca Ala	2728
aaa Lys	ttg Leu 820	cga Arg	gcg Ala	atg Met	aag Lys	cca Pro 825	gat Asp	gag Glu	ttt Phe	gcg Ala	caa Gln 830	atc Ile	cag Gln	cag Gln	gcg Ala	2776
gta Val 835	att Ile	acc Thr	cag Gln	atg Met	ctg Leu 840	cag Gln	gca Ala	ccg Pro	caa Gln	acg Thr 845	ctc Leu	ggc Gly	gaa Glu	gaa Glu	gca Ala 850	2824

ES 2 659 155 T3

tcg aag tta agt aaa gat ttc gat cgc ggc aat atg cgc ttc gat tcg 2872
 Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser
 855 860 865

cgf gat aaa atc gtg gcc cag ata aaa ctg ctg acg ccg caa aaa ctt 2920
 Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu
 870 875 880

gct gat ttc ttc cat cag gcg gtg gtc gag ccg caa ggc atg gct att 2968
 Ala Asp Phe Phe His Gln Ala Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile
 885 890 895

ctg tcg cag att tcc ggc agc cag aac ggg aaa gcc gaa tat gta cac 3016
 Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His
 900 905 910

cct gaa ggc tgg aaa gtg tgg gag aac gtc agc gcg ttg cag caa aca 3064
 Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr
 915 920 925 930

atg ccc ctg atg agt gaa aag aat gag tgatgtcgcc gagacactag 3111
 Met Pro Leu Met Ser Glu Lys Asn Glu

atcctttgc 3120

<210> 50
 <211> 962
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 50

Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
 -20 -15 -10

Trp Ala Pro Leu Ser Gln Ala Glu Thr Gly Trp Gln Pro Ile Gln Glu
 -5 -1 1 5

Thr Ile Arg Lys Ser Asp Lys Asp Asn Arg Gln Tyr Gln Ala Ile Arg
 10 15 20 25

Leu Asp Asn Gly Met Val Val Leu Leu Val Ser Asp Pro Gln Ala Val
 30 35 40

Lys Ser Leu Ser Ala Leu Val Val Pro Val Gly Ser Leu Glu Asp Pro
 45 50 55

Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Ala His Tyr Leu Glu His Met Ser Leu Met
 60 65 70

Gly Ser Lys Lys Tyr Pro Gln Ala Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Leu Lys
 75 80 85

10

Met His Gly Gly Ser His Asn Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Arg Thr Ala

ES 2 659 155 T3

90 95 100 105
 Phe Tyr Leu Glu Val Glu Asn Asp Ala Leu Pro Gly Ala Val Asp Arg
 110 115 120
 Leu Ala Asp Ala Ile Ala Glu Pro Leu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Glu
 125 130
 Arg Glu Arg Asn Ala Val Asn Ala Glu Leu Thr Met Ala Arg Thr Arg
 140 145 150
 Asp Gly Met Arg Met Ala Gln Val Ser Ala Glu Thr Ile Asn Pro Ala
 155 160
 His Pro Gly Ser Lys Phe Ser Gly Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ser Asp
 170 175 180 185
 Lys Pro Gly Asn Pro Val Gln Gln Ala Leu Lys Asp Phe His Glu Lys
 190 195 200
 Tyr Tyr Ser Ala Asn Leu Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Asn Lys Pro
 205 210 215
 Leu Pro Glu Leu Ala Lys Met Ala Ala Asp Thr Phe Gly Arg Val Pro
 220 225 230
 Asn Lys Glu Ser Lys Lys Pro Glu Ile Thr Val Pro Val Val Thr Asp
 235 240 245
 Ala Gln Lys Gly Ile Ile Ile His Tyr Val Pro Ala Leu Pro Arg Lys
 250 255 260 265
 Val Leu Arg Val Glu Phe Arg Ile Asp Asn Asn Ser Ala Lys Phe Arg
 270 275 280
 Ser Lys Thr Asp Glu Leu Ile Thr Tyr Leu Ile Gly Asn Arg Ser Pro
 285 290 295
 Gly Thr Leu Ser Asp Trp Leu Gln Lys Gln Gly Leu Val Glu Gly Ile
 300 305 310
 Ser Ala Asn Ser Asp Pro Ile Val Asn Gly Asn Ser Gly Val Leu Ala
 315 320 325
 Ile Ser Ala Ser Leu Thr Asp Lys Gly Leu Ala Asn Arg Asp Gln Val
 330 335 340 345

ES 2 659 155 T3

Val Ala Ala Ile Phe Ser Tyr Leu Asn Leu Leu Arg Glu Lys Gly Ile
 350 355 360
 Asp Lys Gln Tyr Phe Asp Glu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Phe
 365 370 375
 Arg Tyr Pro Ser Ile Thr Arg Asp Met Asp Tyr Val Glu Trp Leu Ala
 380 385 390
 Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn
 395 400 405
 Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met
 410 415 420 425
 Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro
 430 435 440
 His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys
 445 450 455
 Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile
 460 465 470
 Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser
 475 480 485
 Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp
 490 495 500 505
 Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser
 510 515 520
 Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met
 525 530 535
 Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala
 540 545 550
 Gly Leu Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Gln Ala Ser Val Gly Gly Ile
 555 560 565
 Ser Phe Ser Thr Asn Ala Asn Asn Gly Leu Met Val Asn Ala Asn Gly
 570 575 580 585
 Tyr Thr Gln Arg Leu Pro Gln Leu Phe Gln Ala Leu Leu Glu Gly Tyr
 590 595 600

ES 2 659 155 T3

Phe Ser Tyr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Glu Gln Ala Lys Ser Trp
 605 610 615
 Tyr Asn Gln Met Met Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Ala Phe Glu Gln
 620 625 630
 Ala Ile Met Pro Ala Gln Met Leu Ser Gln Val Pro Tyr Phe Ser Arg
 635 640 645
 Asp Glu Arg Arg Lys Ile Leu Pro Ser Ile Thr Leu Lys Glu Val Leu
 650 655 660 665
 Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Ser Gly Ala Arg Pro Glu Phe Met Val
 670 675 680
 Ile Gly Asn Met Thr Glu Ala Gln Ala Thr Thr Leu Ala Arg Asp Val
 685 690 695
 Gln Lys Gln Leu Gly Ala Asp Gly Ser Glu Trp Cys Arg Asn Lys Asp
 700 705 710
 Val Val Val Asp Lys Lys Gln Ser Val Ile Phe Glu Lys Ala Gly Asn
 715 720 725
 Ser Thr Asp Ser Ala Leu Ala Ala Val Phe Val Pro Thr Gly Tyr Asp
 730 735 740 745
 Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ile Val Gln
 750 755 760
 Pro Trp Phe Tyr Asn Gln Leu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Gly Tyr Ala
 765 770 775
 Val Phe Ala Phe Pro Met Ser Val Gly Arg Gln Trp Gly Met Gly Phe
 780 785 790
 Leu Leu Gln Ser Asn Asp Lys Gln Pro Ser Phe Leu Trp Glu Arg Tyr
 795 800 805
 Lys Ala Phe Phe Pro Thr Ala Glu Ala Lys Leu Arg Ala Met Lys Pro
 810 815 820 825
 Asp Glu Phe Ala Gln Ile Gln Gln Ala Val Ile Thr Gln Met Leu Gln
 830 835 840
 Ala Pro Gln Thr Leu Gly Glu Glu Ala Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe
 845 850 855

ES 2 659 155 T3

Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln
860 865 870

Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala
875 880 885

Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser
890 895 900 905

Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp
910 915 920

Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys
925 930 935

Asn Glu

<210> 51

<211> 729

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> DsbC de tipo salvaje que comprende his-tag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

15 <400> 51

atg aag aaa ggt ttt atg ttg ttt act ttg tta gcg gcg ttt tca ggc 48
Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
1 5 10 15

ttt gct cag gct gat gac gcg gca att caa caa acg tta gcc aaa atg 96
Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
20 25 30

ggc atc aaa agc agc gat att cag ccc gcg cct gta gct ggc atg aag 144
Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
35 40 45

aca gtt ctg act aac agc ggc gtg ttg tac atc acc gat gat ggt aaa 192
Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
50 55 60

cat atc att cag ggg cca atg tat gac gtt agt ggc acg gct ccg gtc 240
His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
65 70 75 80

aat gtc acc aat aag atg ctg tta aag cag ttg aat gcg ctt gaa aaa 288
Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
85 90 95

ES 2 659 155 T3

gag atg atc gtt tat aaa gcg ccg cag gaa aaa cac gtc atc acc gtg 336
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110

ttt act gat att acc tgt ggt tac tgc cac aaa ctg cat gag caa atg 384
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125

gca gac tac aac gcg ctg ggg atc acc gtg cgt tat ctt gct ttc ccg 432
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140

cgc cag ggg ctg gac agc gat gca gag aaa gaa atg aaa gct atc tgg 480
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160

tgt gcg aaa gat aaa aac aaa gcg ttt gat gat gtg atg gca ggt aaa 528
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175

agc gtc gca cca gcc agt tgc gac gtg gat att gcc gac cat tac gca 576
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190

ctt ggc gtc cag ctt ggc gtt agc ggt act ccg gca gtt gtg ctg agc 624
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205

aat ggc aca ctt gtt ccg ggt tac cag ccg ccg aaa gag atg aaa gaa 672
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220

ttc ctc gac gaa cac caa aaa atg acc agc ggt aaa cac cat cac cat 720
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys His His His His
 225 230 235 240

cac cac taa 729
 His His

<210> 52

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 52

Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30

Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45

ES 2 659 155 T3

Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys His His His His
 225 230 235 240
 His His

REIVINDICACIONES

- 1.- Una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende:
- a) un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC; y
- 5 b) uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154;
- c) un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene 50% o menos de la actividad proteasa de una proteína Tsp no mutada de tipo salvaje según se muestra en SEQ ID NO:26; y
- d) un gen spr mutado que codifica una proteína spr cuya secuencia de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:24 que comprende una mutación que afecta al aminoácido C94; y
- 10 en la que dicha célula bacteriana gram-negativa se selecciona de las cepas K12 y W3110 de E. coli, y en la que la célula bacteriana es isogénica con dichas cepas excepto por el polinucleótido recombinante que codifica DsbC, dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y el gen Tsp mutado y el gen spr mutado.
- 15 2.- La célula bacteriana gram-negativa según la reivindicación 1, en la que DsbC comprende un marcador de histidina en el N-terminal o el C-terminal.
- 3.- La célula bacteriana gram-negativa según la reivindicación 1 o 2, en la que el vector de expresión comprende un polinucleótido que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:51.
- 4.- La célula bacteriana gram-negativa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende tres CDR que tienen la secuencia indicada en SEQ ID NO:1 para CDRH1, SEQ ID NO:2 para CDRH2 y SEQ ID NO:3 para CDRH3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende tres CDR que tienen la secuencia indicada en SEQ ID NO:4 para CDRL1, SEQ ID NO:5 para CDRL2 y SEQ ID NO:6 para CDRL3.
- 20 5.- La célula bacteriana gram-negativa según la reivindicación 4, en la que dichos uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo comprenden la secuencia de la región variable de cadena ligera indicada en SEQ ID NO:8 y la región variable de cadena pesada indicada en SEQ ID NO:10.
- 25 6.- La célula bacteriana gram-negativa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el anticuerpo es un fragmento Fab o Fab'.
- 7.- La célula bacteriana gram-negativa según la reivindicación 6, en la que el fragmento Fab o Fab' comprende una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:12 y una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:14 o 16.
- 30 8.- La célula bacteriana gram-negativa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la célula bacteriana gram-negativa comprende un primer vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC, y un segundo vector de expresión que comprende uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.
- 35 9.- La célula bacteriana gram-negativa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC comprende además uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154.
- 40 10.- La célula bacteriana gram-negativa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mutación en el gen spr que codifica una proteína spr da como resultado un cambio del aminoácido cisteína a alanina en la posición 94 (C94A).
- 45 11.- La célula bacteriana gram-negativa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y un mensaje dicistrónico para producir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, en la que el cistrón cadena arriba contiene ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón cadena abajo contiene ADN que codifica la correspondiente cadena pesada, que se caracteriza porque el mensaje dicistrónico comprende una secuencia seleccionada de IGS1 (SEQ ID NO:33), IGS2 (SEQ ID NO:34), IGS3 (SEQ ID NO:35) e IGS4 (SEQ ID NO:36).
- 50 12.- Un método para producir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, que comprende:
- a) cultivar una célula bacteriana gram-negativa recombinante, según se define en cualquiera de las reivindicaciones

1 a 11, en un medio de cultivo bajo condiciones eficaces para expresar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, y el polinucleótido recombinante que codifica DsbC; y

b) recuperar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a CD154, del periplasma de la célula bacteriana gram-negativa recombinante y/o del medio de cultivo.

5 13.- Un método según la reivindicación 12, en el que el método comprende además una etapa de unir una molécula efectora a un aminoácido en el extremo C-terminal o hacia el extremo C-terminal de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo.

14.- Un método según la reivindicación 13, en el que la molécula efectora comprende polietilenglicol o metoxipolietilenglicol.

10 15.- Un método según la reivindicación 14, en el que el método comprende unir a uno de los restos cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, en el que cada grupo amino del resto lisilo lleva unido covalentemente un resto metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

Figura 1

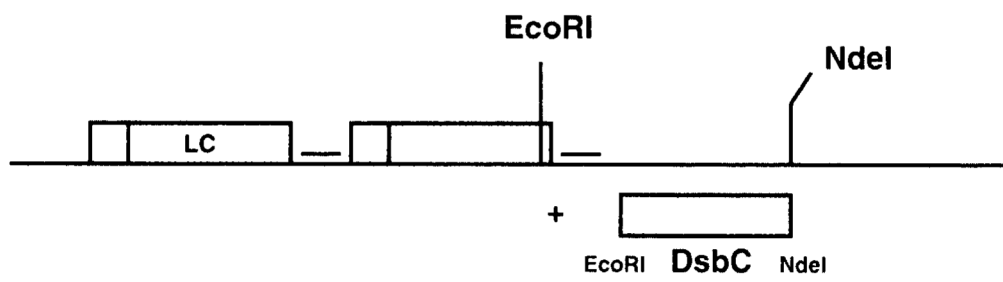


Figura 2

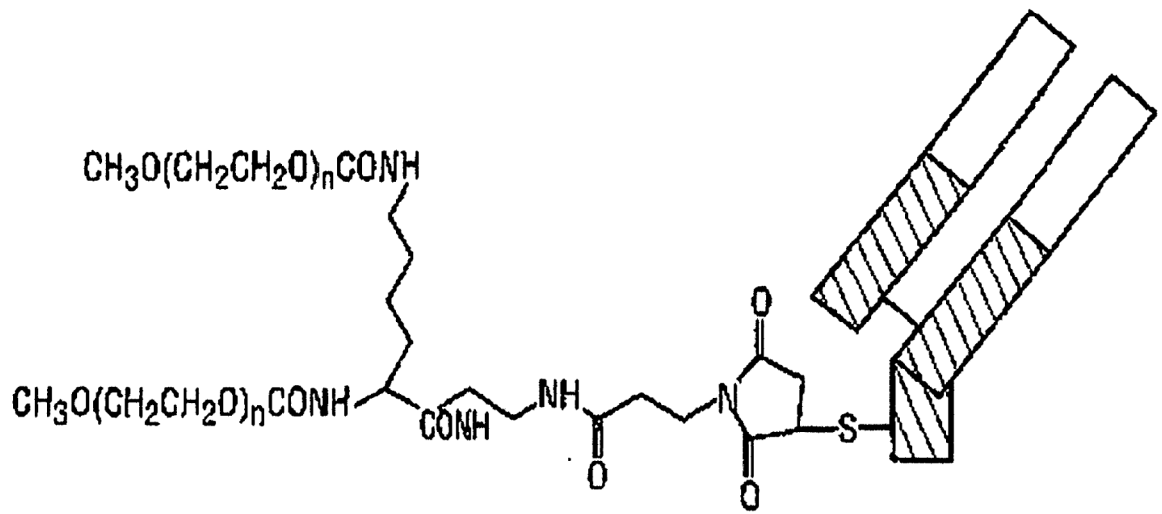


Figura 3

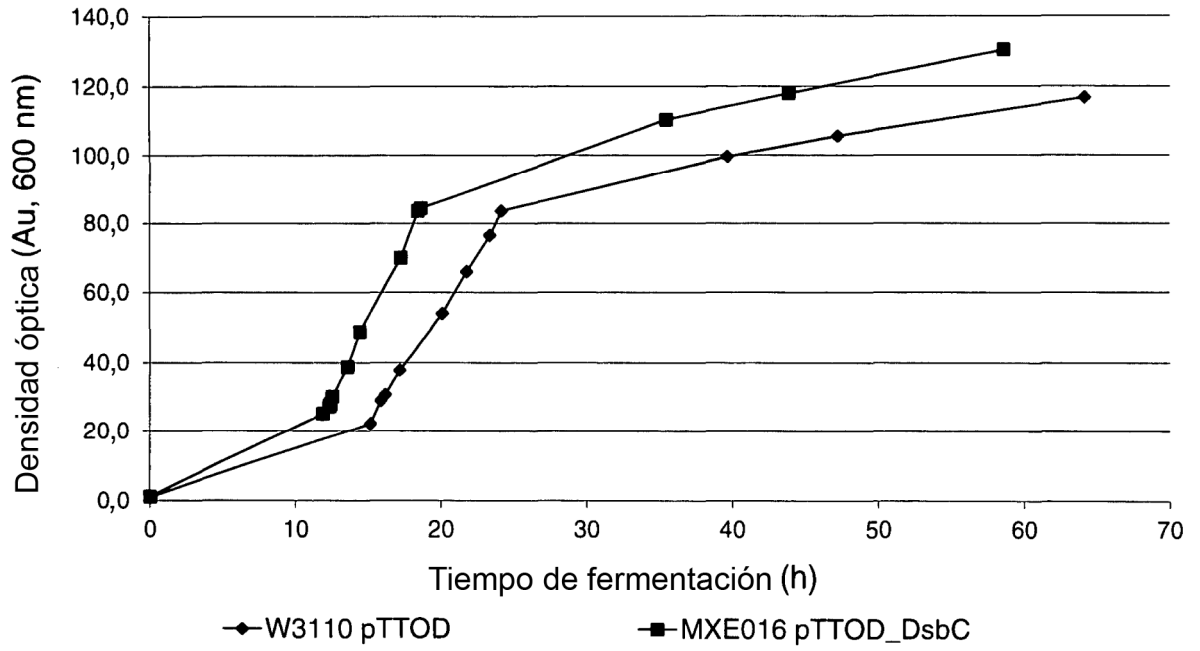


Figura 4

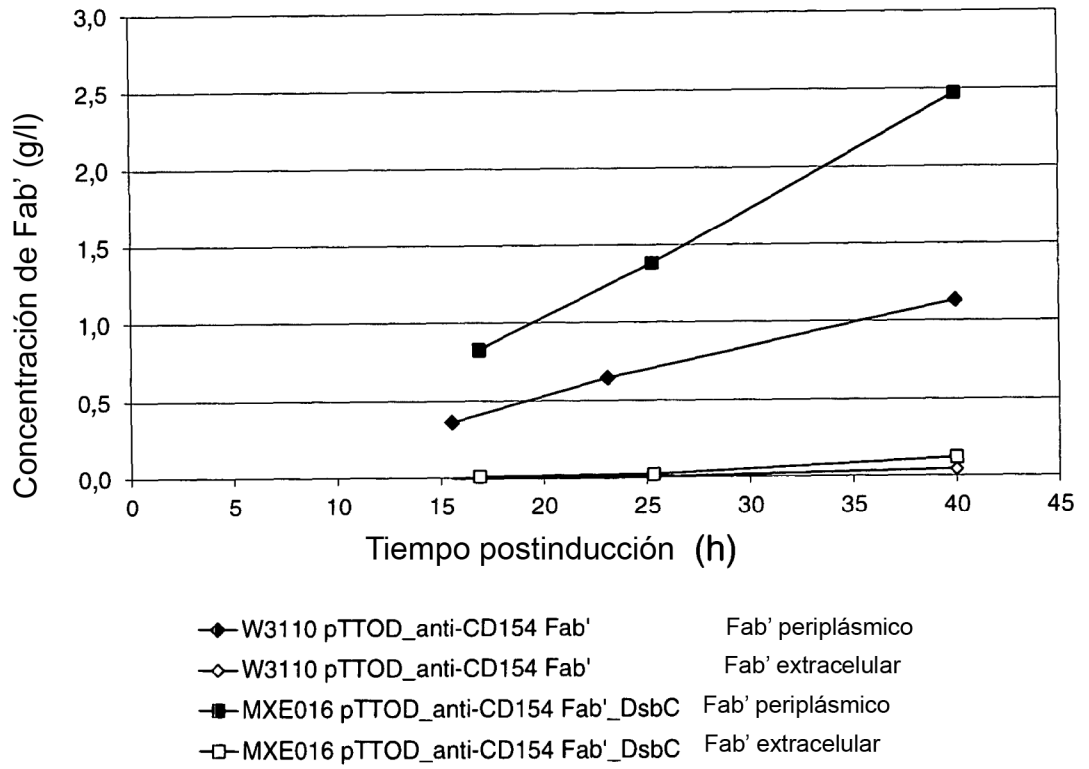


Figura 5

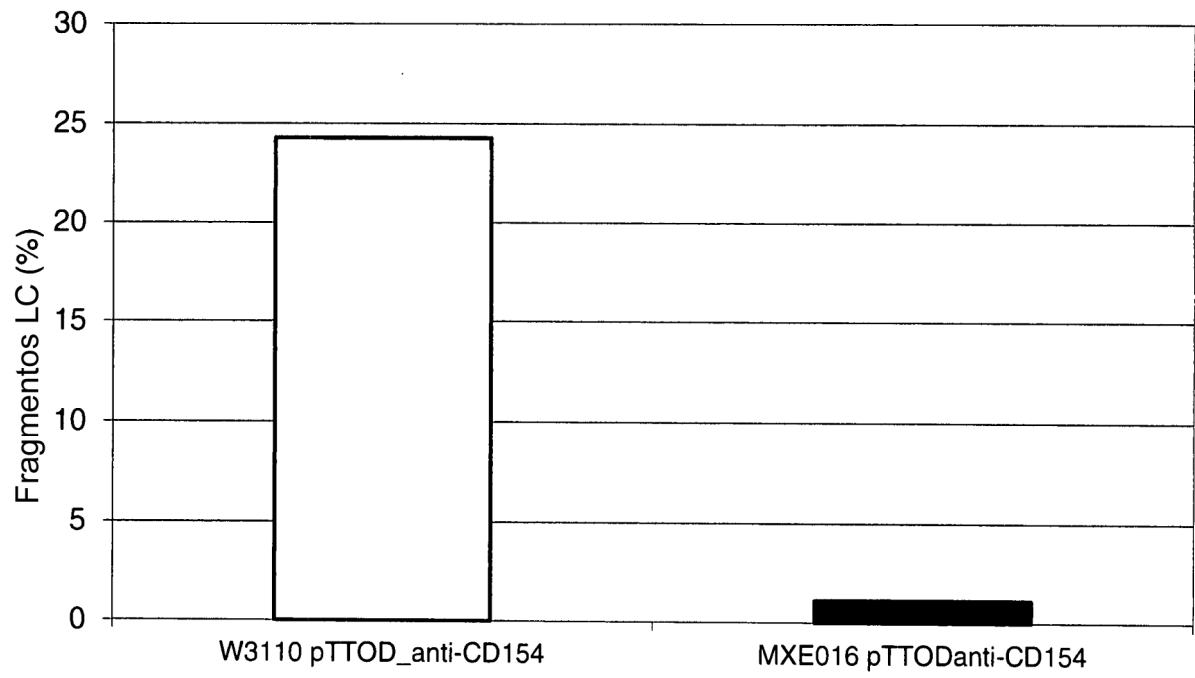


Figura 6

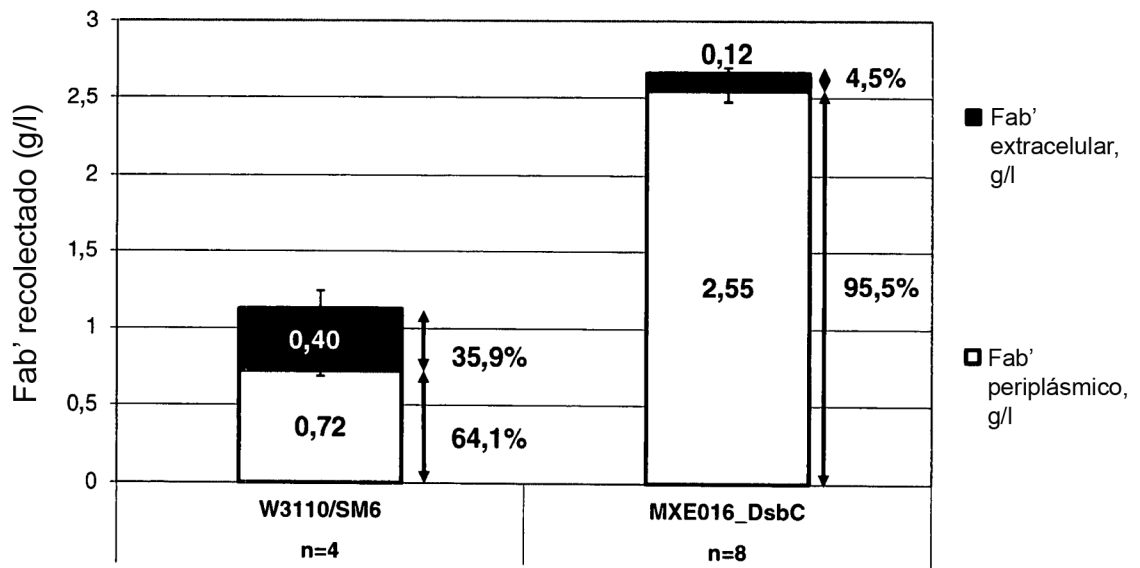


Figura 7

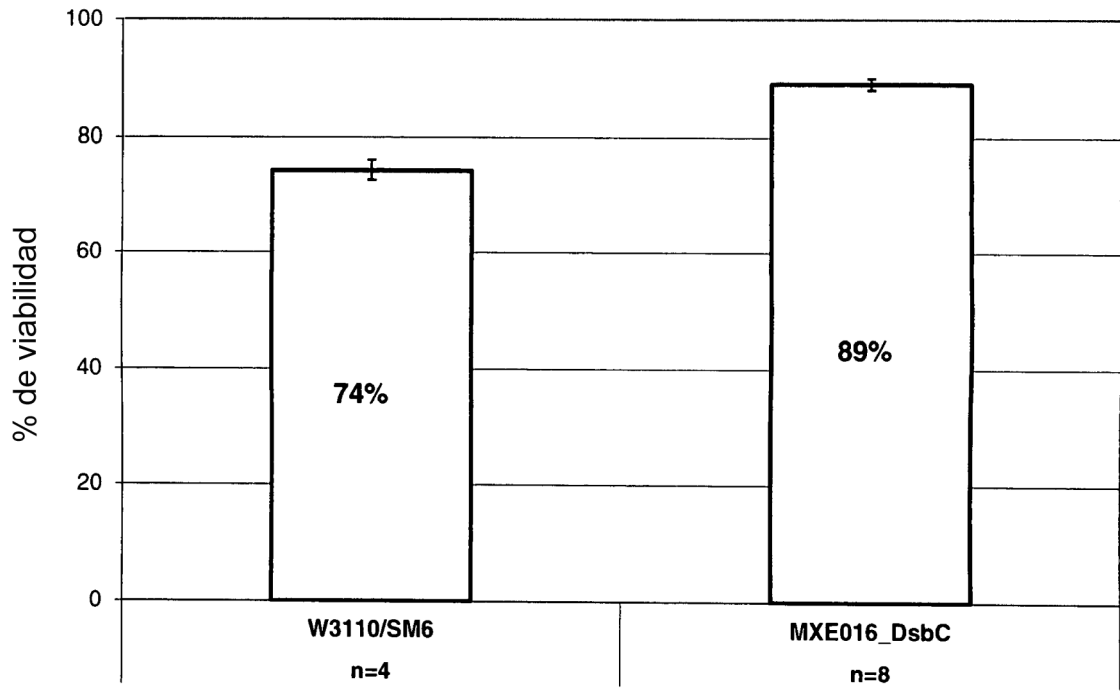


Figura 8

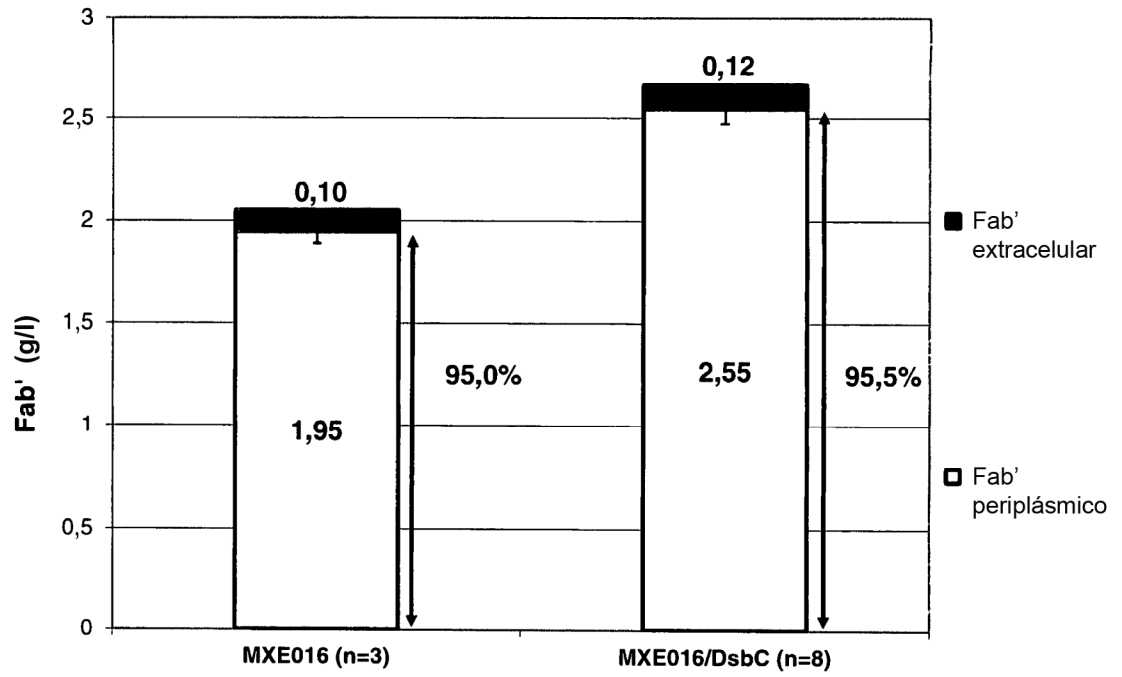


Figura 9

ptr de tipo salvaje (proteasa III) 5'.

```

* M P R S T W F K A L L L L V
TGA ATG CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

A L W A P L S
GCC CTT TGG GCA CCC TTA AGT
    
```

Δ ptr mutado (proteasa III) 5'.

```

EcoR I
~~~~~
* I P R S T W F K A L L L L V
TGA ATT CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

Ase I
~~~~~
A L W A H * C
GCC CTT TGG GCA CAT TAA TGT
    
```

Figura 10

Tsp de tipo salvaje 5'.

M N M F F R L T A L A G L L A
ATG AAC **ATG** TTT TTT AGG CTT ACC GCG TTA GCT GGC CTG CTT GCA

 I A G Q T F A
 ATA GCA GGC CAG ACC TTC GCT

Δ Tsp mutado 5'.

EcoR I
 ~~~~~  
 M N S F L G L P R \* L A C L Q  
ATG AAT **TCG** TTT TTA GGC TTA CCG CGT TAG CTG GCC TGC TTG CAA  
  
*Ase I*  
 ~~~~~  
 * Q A R H * L
 TAG CAG GCC AGA **CAT TAA** TTG

Figura 11

DegP de tipo salvaje

202 D A A I N R G N S G G
949 GAT GCA GCG ATC AAC CGT GGT AAC **TCC** GGT GGT

DegP S210A mutado

Ase I
~~~~~  
202 D A A I N R G N A G G  
949 GAT GCA GCG **ATT AAT** CGT GGT AAC **GCC** GGT GGT