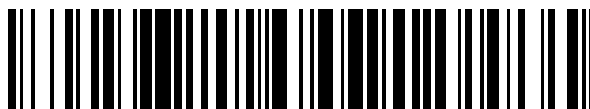


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 811**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010** **E 15182886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 2993231**

54 Título: **Cepa bacteriana para expresión de proteína recombinante que tiene los genes DEGP deficiente de proteasa que retiene actividad chaperona y TSP y PTR desactivados génicamente**

30 Prioridad:

24.09.2009 GB 0916822

24.09.2009 GB 0916821

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2018

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 2 692 811 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 bacteriana para expresión de proteína recombinante que tiene los genes DEGP deficiente de proteasa que retiene actividad chaperona y TSP y PTR desactivados génicamente

La invención se refiere a una cepa hospedadora bacteriana recombinante, particularmente *E. coli*. La invención se refiere también a un método para producir una proteína de interés en tal célula.

Antecedentes de la invención

Las células bacterianas, tales como *E. coli*, se usan comúnmente para producir proteínas recombinantes. Hay muchas ventajas en usar células bacterianas, tales como *E. coli*, para producir proteínas recombinantes, particularmente debido a la naturaleza versátil de las células bacterianas como células hospedadoras que permiten la inserción génica a través de plásmidos. *E. coli* se ha usado para producir muchas proteínas recombinantes, incluyendo insulina humana.

A pesar de las muchas ventajas de usar células bacterianas para producir proteínas recombinantes, hay todavía limitaciones significativas que incluyen la dificultad de producir proteínas sensibles a proteasa. Las proteasas desempeñan un papel importante en el recambio de proteínas antiguas y mal plegadas en el periplasma y citoplasma de *E. coli*. Las proteasas bacterianas actúan degradando la proteína de interés recombinante, reduciendo así significativamente a menudo el rendimiento de proteína activa.

Se han identificado una serie de proteasas bacterianas, En *E. coli* se han identificado proteasas que incluyen proteasa III (ptr), DegP, OmpT, Tsp, prlC, ptrA, ptrB, pepA-T, tsh, espc, eatA, clpP e lon.

La proteína proteasa III (ptr) es una proteasa periplásmica de 110 kDa que degrada proteínas de alto peso molecular.

La 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*"; Nagasawa H, Sakagami Y, Suzuki A, Suzuki H, Hara H, Hirota Y. J Bacteriol. Nov. de 1989; 171(11): 5890-3 y "Cloning, mapping and characterization of the *Escherichia coli* Tsp gene which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3"; Hara H, Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y. J Bacteriol. agosto de 1991; 173(15): 4799-813), pero se descubrió más tarde que la Tsp era también capaz de escindir proteínas de cola de fago y, por lo tanto, se renombró como proteasa específica de cola (Tsp) (Silber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 295-299 (1992)). Silber et al. ("Deletion of the prc(tsp) gene provides evidence for additional tail-specific proteolytic activity in *Escherichia coli* K-12"; Silber, K.R., Sauer, R.T.; Mol Gen Genet 1994 242:237-240) describe una cepa de delección de prc (KS1000) en la que se creó la mutación reemplazando un segmento del gen prc por un fragmento que comprendía un marcador Kan^r.

La DegP (también conocida como HtrA) es una proteína de 46 kDa que tiene función dual como chaperona y proteasa ("Families of serine peptidases"; Rawlings ND, Barrett AJ. Methods Enzymol. 1994; 244:19-61).

Es conocido desactivar génicamente proteasas bacterianas para afectar al rendimiento de la proteína recombinante.

Georgiou et al. ("Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo". Baneyx F, Georgiou G.J Bacteriol. abril de 1991; 173(8): 2696-703) estudiaron los efectos sobre las propiedades de crecimiento y la estabilidad de proteína de cepas de *E. coli* deficientes en proteasa III construidas por inactivación insercional del gen ptr y se observó un aumento de la expresión de un polipéptido secretado sensible a proteasa. Se produjo también una cepa que comprendía la mutación ptr y era también deficiente en la proteasa secretada DegP, y se encontró que tenía una tasa de crecimiento reducida y un aumento de la expresión proteica. En Georgiou et al., se construyeron cepas de *E. coli* deficientes en proteasa III y/o DegP a partir de la cepa parental KS272 que comprende ya una serie de mutaciones genómicas.

El documento US 5264365 (Georgiou et al.) divulga la construcción de hospedadores de *Escherichia coli* deficientes en proteasa que, cuando se combinan con un sistema de expresión, son útiles para la producción de polipéptidos proteolíticamente sensibles.

Meerman et al. ("Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in All Known Loci Affecting the Proteolytic Stability of Secreted Recombinant Proteins". Meerman H. J., Georgeou G., Nature Biotechnology, 1994 Nov; 12; 1107-1110) divulgan cepas de *E. coli* que comprenden mutaciones en rpoH, el factor sigma de ARN polimerasa responsable de la síntesis de proteína de choque térmico, y diferentes combinaciones de mutaciones en genes de proteasa incluyendo DegP, proteasa III, Tsp (Prc) y OmpT, donde se causaron mutaciones nulas de los genes de proteasa por mutaciones insercionales. En Meerman et al, se construyeron cepas de *E. coli* deficientes en una o más de Tsp, proteasa III y DegP a partir de la cepa parental KS272 que comprende ya una serie de mutaciones genómicas.

El documento US 5508192 (Georgiou et al.) divulga un método de producción de polipéptidos recombinantes en hospedadores bacterianos deficientes en proteasa y constructos de bacterias deficientes en una, dos, tres y cuatro proteasas que portan también una mutación en el gen *rpoH*.

Chen et al describe la construcción de cepas de *E. coli* portadoras de diferentes combinaciones de mutaciones en *prc* (Tsp) y DegP creadas por amplificación de las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen y ligamiento de estas conjuntamente en un vector que comprende marcadores de selección y una mutación *sprW148R* ("High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of Escherichia coli requires a triple-mutant (Δ DegP Δ prc *sprW148R*) host strain". Chen C, Snedecor B, Nishihara JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Champion KM. *Biotechnol Bioeng.* 5 de marzo de 2004; 85(5): 463-74). La combinación de mutaciones Δ DegP, Δ prc y *W148Rspr* se encontró que proporcionaba los mayores niveles de cadena ligera de anticuerpo, cadena pesada de anticuerpo y F(ab')₂-LZ. El documento EP1341899 divulga una cepa de *E. coli* que es deficiente en DegP y *prc* cromosómicos que codifican las proteasas DegP y Prc, respectivamente, y alberga un gen *spr* mutante que codifica una proteína que suprime fenotipos de crecimiento exhibidos por cepas que albergan mutantes de *prc*.

Kandilogiannaki et al (Expression of a recombinant human anti-MUC1 scFv fragment in protease-deficient Escherichia coli mutants. Kandilogiannaki M, Koutsoudakis G, Zafiropoulos A, Krambovitis E. *Int J Mol Med.* junio de 2001; 7(6): 659-64) describe la utilización de una cepa deficiente en proteasa para la expresión de una proteína scFv.

Las cepas bacterianas deficientes en proteasa usadas anteriormente para expresar proteínas recombinantes comprenden mutaciones adicionales de genes implicados en el metabolismo celular y la replicación de ADN tales como, por ejemplo, *phoA*, *fluA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* y *pro* en cepas de *E. coli*. Estas mutaciones pueden tener muchos efectos nocivos sobre la célula hospedadora, incluyendo efectos sobre el crecimiento celular, estabilidad, rendimiento de expresión de proteína recombinante y toxicidad. Las cepas que tienen una o más de estas mutaciones genómicas, particularmente cepas que tienen un alto número de estas mutaciones pueden exhibir una pérdida de aptitud que reduce la tasa de crecimiento bacteriano a un nivel que no es adecuado para la producción de proteína industrial. Adicionalmente, cualquiera de las mutaciones genómicas anteriores puede afectar a otros genes en *cis* y/o en *trans* de modos dañinos impredecibles, alterando sí el fenotipo, aptitud y perfil proteico de la cepa. Adicionalmente, el uso de células fuertemente mutadas no es generalmente adecuado para producir proteínas recombinantes para uso comercial, particularmente productos terapéuticos, porque tales cepas tienen generalmente rutas metabólicas defectivas y por ello pueden crecer mal o nada en absoluto en medios mínimos o definidos químicamente.

Las cepas bacterianas deficientes en proteasa comprenden típicamente también mutaciones de desactivación génica de uno o más genes que codifican proteasa que se han creado por inserción de una secuencia de ADN en la secuencia de codificación génica. La secuencia de ADN insertada codifica típicamente un marcador de selección tal como un gen de resistencia a antibiótico. Aunque este método de mutación puede ser eficaz para desactivar génicamente la proteasa diana, hay muchas desventajas asociadas a este método. Es una desventaja que la inserción de ADN extraño, tal como un gen de resistencia a antibiótico, causa desestabilización del genoma del hospedador, lo que puede dar como resultado cualquier número de efectos indeseados, incluyendo la sobreexpresión de proteínas dañinas y/o la regulación negativa o desactivación génica de otras proteínas esenciales. Este efecto es particularmente evidente para aquellos genes colocados inmediatamente en dirección 5' o 3' del gen de proteasa diana. Una desventaja adicional de la inserción de ADN extraño, particularmente genes de resistencia a antibiótico, es las modificaciones fenotípicas desconocidas en la célula hospedadora que pueden afectar a la expresión de la proteína diana y/o al crecimiento de la célula hospedadora y pueden hacer también a la célula hospedadora inadecuada para la producción de proteínas pretendidas para uso terapéutico. Las proteínas de resistencia a antibiótico son particularmente desventajosas por los requisitos de bioseguridad de la fabricación a gran escala, particularmente para la producción de productos terapéuticos para administración humana. Es una desventaja adicional de la inserción de marcadores de resistencia a antibiótico la carga metabólica sobre la célula creada por la expresión de la proteína codificada por el gen de resistencia a antibiótico. El uso de marcadores de resistencia a antibiótico para uso como marcadores para manipulaciones genéticas tales como mutaciones de desactivación génica está también limitado por el número de diferentes marcadores de resistencia a antibiótico disponibles.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de proporcionar nuevas cepas bacterianas que proporcionen medios ventajosos para producir proteínas recombinante.

Compendio de la invención

Es un objetivo de la presente invención resolver uno o más de los problemas descritos anteriormente.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:

a. un gen Tsp mutado, en el que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica;

en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por el gen Tsp mutado y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

Además, la presente invención proporciona una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:

- 5 a. un gen Tsp mutado, en el que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica; y
- b. un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa,

en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por los genes Tsp y DegP mutados y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

Además, la presente invención proporciona una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:

- 10 a. un gen Tsp mutado, en el que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica; y
- b. un gen ptr mutado por desactivación génica,

en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por los genes Tsp y ptr mutados y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

- 15 Se divulga también una célula que comprende un gen ptr mutado, en la que el gen ptr mutado codifica una proteína proteasa III que tiene actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado por desactivación génica y ningún gen de proteasa mutado adicional. Por consiguiente, la divulgación describe una célula que es isogénica de una célula bacteriana de tipo silvestre, excepto por el gen ptr mutado y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

- 20 Se divulga adicionalmente una célula que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida y ningún gen de proteasa mutado adicional. Por consiguiente, la divulgación describe una célula que es isogénica de una célula bacteriana de tipo silvestre, excepto por el gen DegP mutado y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

- 25 Se divulga adicionalmente una célula que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, un gen ptr mutado en el que el gen ptr mutado codifica una proteína proteasa III que tiene actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado por desactivación génica y ningún gen de proteasa mutado adicional. Por consiguiente, la divulgación describe una célula que es isogénica de una célula bacteriana de tipo silvestre excepto por el gen DegP mutado y el gen ptr mutado y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

- 30 En una realización preferida, el gen ptr mutado y/o el gen Tsp mutado a los que se hace referencia anteriormente son mutaciones de desactivación génica.

Los presentes inventores han encontrado que una cepa hospedadora bacteriana isogénica de una célula bacteriana de tipo silvestre, excepto por las una o más proteasas mutadas anteriores, proporciona un hospedador ventajoso para producir una proteína de interés recombinante. Las células de *E. coli* proporcionadas por la presente invención

- 35 tienen actividad proteasa reducida en comparación con una célula no mutada, lo que puede reducir la proteólisis de una proteína de interés recombinante, particularmente proteínas de interés que son proteolíticamente sensibles. Además, la célula de *E. coli* según la presente invención porta solo las mutaciones mínimas de la secuencia genómica para introducir una o más de las mutaciones de proteasa anteriores y no porta ninguna otra mutación que pueda tener efectos nocivos sobre el crecimiento celular y/o la capacidad de expresar una proteína de interés.

- 40 Una o más de las células de *E. coli* proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un alto rendimiento de la proteína de interés recombinante. Una o más de las células de *E. coli* proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar una tasa de producción rápida de una proteína de interés. Una o más de las células de *E. coli* pueden proporcionar un rendimiento inicial rápido de la proteína de interés recombinante. Adicionalmente, una o más células de *E. coli* pueden mostrar buenas características de crecimiento.

- 45 En un segundo aspecto, la divulgación describe una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:

a. un gen Tsp mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen; y/o

- 50 b. un gen ptr mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen; y

c. opcionalmente un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* que comprende un gen Tsp mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

La divulgación describe también una célula que comprende un gen ptr mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP mutada que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida y un gen Tsp mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* que comprende un gen ptr mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen y un gen Tsp mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

Se divulga adicionalmente una célula que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida y un gen ptr mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, un gen ptr mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen y un gen Tsp mutado por desactivación génica que comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

La célula descrita en el segundo aspecto supera las desventajas anteriormente descritas de métodos de mutación por desactivación génica que emplean inserción de ADN usados típicamente en la técnica para proporcionar cepas deficientes en proteasa. En la presente invención, las mutaciones por desactivación génica del gen ptr y/o el gen Tsp se proporcionan por una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen. Una mutación, tal como una mutación puntual con cambio de sentido, en el codón de iniciación del gen de desactivación génica diana, asegura que el gen diana no comprenda un codón de iniciación adecuado en el inicio de la secuencia de codificación. La inserción de uno o más codones de terminación colocados entre el codón de iniciación y el codón de terminación del gen asegura que, incluso si se inicia la transcripción del gen, no se transcribirá la secuencia de codificación completa. El genoma hospedador requeriría una desestabilización mínima para mutar el codón de iniciación y/o insertar uno o más codones de terminación, minimizando así los efectos nocivos de la desestabilización del genoma sobre la expresión de la proteína diana y/o el crecimiento de la célula hospedadora. La célula de *E. coli* de la presente invención puede ser también más adecuada para la producción de proteínas pretendidas para uso como productos terapéuticos debido a la desestabilización mínima del genoma celular.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína de interés recombinante que comprende expresar la proteína de interés recombinante en una célula de *E. coli* recombinante de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a muestra el extremo 5' de las secuencias proteica y génica de ptr de tipo silvestre (proteasa III) y ptr mutado por desactivación génica (proteasa III).

La Figura 1b muestra el extremo 5' de las secuencias proteica y génica de Tsp de tipo silvestre y Tsp mutado por desactivación génica.

La Figura 1c muestra una región de las secuencias proteica y génica de DegP de tipo silvestre y DegP mutado.

La Figura 2 muestra el crecimiento de la cepa MXE001 de *E. coli* portadora de un gen Tsp mutado por desactivación

génica y la cepa MXE005 de *E. coli* portadora de un gen Tsp mutado por desactivación génica y un gen DegP mutado en comparación con W3110 de *E. coli* de tipo silvestre.

La Figura 3 muestra la expresión de un Fab' en MXE005 y MXE001 en comparación con W3110 de tipo silvestre.

- 5 La Figura 4 muestra el crecimiento de la cepa MXE004 de *E. coli* portadora de un gen Tsp mutado por desactivación génica y una proteasa III mutada por desactivación génica en comparación con W3110 de tipo silvestre.

La Figura 5 muestra la expresión de un Fab' en MXE004 y W3110.

La Figura 6 muestra la expresión de un Fab en MXE001, MXE004, MXE005 y W3110.

La Figura 7 muestra la expresión de cadena ligera (cadena L), cadena pesada (cadena H) y Fab' durante un experimento de fermentación para MXE001, MXE005 y W3110 de tipo silvestre.

- 10 La Figura 8 muestra los resultados de un análisis de transferencia Western para W3110 de tipo silvestre, MXE001 y MXE005 que muestran la fragmentación relativa de un Fab'.

La Figura 9 muestra el perfil de crecimiento de MXE001 en comparación con W3110 de control.

La Figura 10 muestra el rendimiento de Fab' del sobrenadante (líneas de puntos) y periplasma (líneas continuas) de la cepa MXE001 de *E. coli* en comparación con W3110 de *E. coli* de control.

- 15 La Figura 11 muestra el rendimiento de Fab' total de sobrenadante y periplasma de la cepa MXE001 de *E. coli* en comparación con W3110 de control.

La Figura 12 muestra la tasa de producción específica de Fab' de la cepa MXE001 de *E. coli* en comparación con W3110 de control.

La Figura 13 muestra el perfil de crecimiento de MXE004 y MXE005 en comparación con W3110 de control.

- 20 La Figura 14 muestra rendimientos de Fab' de sobrenadante (líneas de puntos) y periplasma (líneas continuas) de las cepas MXE004, MXE005 y el control W3110 de *E. coli*.

La Figura 15 muestra el rendimiento de Fab' total de sobrenadante y periplasma de las cepas MXE004 y MXE005 de *E. coli*.

- 25 La Figura 16 muestra la tasa de producción específica de Fab' de las cepas MXE004 y MXE005 y el control W3110 de *E. coli*.

La Figura 17 muestra el perfil de crecimiento de las cepas W3110, MXE001, MXE004 y MXE005 de *E. coli* en comparación con las cepas XL1 Blue, TOP10, Stbl 3 y Sure de *E. coli*.

Breve descripción de las secuencias

- 30 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN del gen Tsp no mutado incluyendo los 6 nucleótidos ATGAAC en dirección 5' del codón de iniciación.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia aminoacídica de la proteína Tsp no mutada.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ADN de un gen Tsp mutado por desactivación génica incluyendo los 6 nucleótidos ATGAAT en dirección 5' del codón de iniciación.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ADN del gen de proteasa III no mutado.

- 35 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia aminoacídica de la proteína proteasa III no mutada.

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN de un gen de proteasa III mutado por desactivación génica.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN de un gen DegP no mutado.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia aminoacídica de la proteína DegP no mutada.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ADN de un gen DegP mutado.

- 40 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia aminoacídica de una proteína DegP mutada.

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF.

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF.

La SEQ ID NO: 13 es la secuencia aminoacídica de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF.

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia aminoacídica de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF.

La SEQ ID NO: 15 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' de la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

5 La SEQ ID NO: 16 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' de la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' de la región del gen de proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

10 La SEQ ID NO: 18 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' de la región del gen de proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

La SEQ ID NO: 19 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' de la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

La SEQ ID NO: 20 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' de la presión del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción.

15 Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, los presentes inventores han proporcionado una célula de E. coli recombinante adecuada para expresar una proteína de interés que comprende solo las mutaciones mínimas del genoma requeridas para introducir una o más mutaciones de proteasa. En un segundo aspecto de la divulgación, la célula bacteriana comprende mutaciones por desactivación génica de Tsp y/o proteasa III, en el que el gen Tsp y/o de proteasa III comprende una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen.

20 Las células de E. coli proporcionadas por la presente invención tienen actividad proteasa reducida en comparación con células no mutadas, lo que puede reducir la proteólisis de una proteína de interés recombinante, particularmente proteínas de interés que son proteolíticamente sensibles. Por lo tanto, una o más de las células de E. coli proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar mayor rendimiento de la proteína de interés recombinante intacta y menor rendimiento, o preferiblemente ningún rendimiento, de fragmentos proteolíticos de la proteína de interés en comparación con una célula bacteriana no mutada.

El especialista en la materia sería capaz de ensayar fácilmente un clon de célula candidata para ver si tiene el rendimiento deseado de una proteína de interés usando métodos bien conocidos en la materia, incluyendo un método de fermentación, ELISA y HPLC de proteína G. Se describen métodos de fermentación adecuados en Humphreys D P, et al. (1997). "Formation of dimeric Fabs in E. coli: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions". J. IMMUNOL. METH. 209: 193-202; Backlund E. Reeks D. Markland K. Weir N. Bowering L. Larsson G. "Fedbatch design for periplasmic product retention in Escherichia coli", Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't Journal of Biotechnology. 135(4): 358-65, 31 de julio de 2008; Champion KM. Nishihara JC. Joly JC. Arnott D. "Similarity of the Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes". [Journal Article] Proteomics. 1(9): 1133-48, sep. de 2001 y Horn U. Strittmatter W. Krebber A. Knupfer U. Kujau M. Wenderoth R. Muller K. Matzku S. Pluckthun A. Riesenberger D. "High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in Escherichia coli, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions", Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't Applied Microbiology & Biotechnology. 46(5-6): 524-32, diciembre de 1996. El especialista sería también capaz de ensayar fácilmente proteína secretada para ver si la proteína está correctamente plegada usando métodos bien conocidos en la materia, tales como HPLC de proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medida de la afinidad de epitopo.

Una o más de las células de E. coli recombinantes de la presente invención pueden exhibir un rendimiento de proteína significativamente mejorado en comparación con una célula bacteriana no mutada. El rendimiento de proteína mejorado puede ser el rendimiento de proteína periplásmica y/o el rendimiento de proteína sobrenadante. Una o más de las células de E. coli recombinantes de la presente invención pueden ser capaces de una tasa de producción más rápida de una proteína de interés y, por lo tanto, puede producirse la misma cantidad de una proteína de interés en un tiempo más corto en comparación con una célula bacteriana no mutada. La tasa de producción más rápida de una proteína de interés puede ser especialmente significativa durante el periodo de crecimiento inicial de la célula de E. coli, por ejemplo, durante las primeras 5, 10, 20 o 30 horas después de la inducción de la expresión de proteína.

Las células de E. coli según la presente invención comprenden una mutación de Tsp, que es preferiblemente la mutación de desactivación génica, sola o en combinación con una mutación de DegP o una mutación de proteasa III. Estas células de E. coli exhiben un mayor rendimiento y un rendimiento inicial más rápido de una proteína de interés

en comparación con una célula no mutada. Son ejemplos de tales estirpes celulares que comprenden el gen Tsp mutado solo o en combinación con el gen DegP mutado o el gen ptr mutado las cepas de células *E. coli* mutantes MXE001 que tiene genotipo Δ Tsp y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13444, MXE004 que tiene genotipo Δ Tsp Δ ptr y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13447, y MXE005 que tiene genotipo Δ Tsp, DegP S210A y depositada el 21 de mayo de 209 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13448.

Adicionalmente, una o más de las células de *E. coli* pueden mostrar buenas características de crecimiento, incluyendo crecimiento y/o reproducción celular, que pueden ser sustancialmente las mismas que una célula bacteriana no mutada o mejoradas en comparación con una célula bacteriana no mutada.

El genoma de la célula de *E. coli* según la presente invención ha tenido una desestabilización mínima del genoma en comparación con una célula de tipo silvestre, reduciendo así los efectos nocivos de otras mutaciones encontradas típicamente en células hospedadoras sobre la expresión de otras proteínas celulares. Por consiguiente, una o más células hospedadoras de *E. coli* recombinantes según el primer aspecto de la presente invención pueden exhibir expresión de proteína mejorada y/o características de crecimiento mejoradas en comparación con células que comprenden mutaciones genomanipuladas adicionalmente de la secuencia genómica.

El genoma de la célula según el segundo aspecto de la divulgación ha tenido una desestabilización mínima del genoma para introducir las mutaciones de desactivación génica, reduciendo así los efectos nocivos de crear desactivaciones génicas de proteasa insertando ADN, tal como marcadores de resistencia a antibiótico. Por consiguiente, una o más células hospedadoras recombinantes según el segundo aspecto de la divulgación pueden exhibir una expresión de proteína mejorada y/o características de crecimiento mejoradas en comparación con células que comprenden mutaciones de desactivación génica de proteasa creadas mediante la inserción de ADN, tal como marcadores de resistencia a antibiótico.

Las células de *E. coli* proporcionadas por la presente invención son también más adecuadas para uso para producir proteínas terapéuticas en comparación con célula que comprenden desestabilizaciones adicionales del genoma celular.

La presente invención se describirá ahora con más detalle. Todas las realizaciones descritas en la presente memoria hacen referencia al primer, segundo y tercer aspectos de la divulgación a menos que se afirme específicamente otra cosa.

Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan intercambiamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique otra cosa. “Péptido” pretende hacer referencia a 10 o menos aminoácidos.

El término “polinucleótido” incluye un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm, etc. a menos que el contexto indique otra cosa.

Como se usa en la presente memoria, el término “comprende” en el contexto de la presente memoria descriptiva debería interpretarse como “incluye”.

Célula no mutada o célula de control en el contexto de la presente invención significa una célula del mismo tipo que la célula de *E. coli* recombinante de la invención en la que la célula no se ha modificado para portar las mutaciones de proteasa anteriores. Por ejemplo, una célula no mutada puede ser una célula de tipo silvestre y puede derivar de la misma población de células hospedadoras que las células de *E. coli* de la invención antes de la modificación para introducir la una o más mutaciones.

Las expresiones “célula”, “estirpe celular”, “cultivo celular” y “cepa” se usan intercambiamente.

El término “isogénico” en el contexto de la presente invención significa que el genoma de la célula de *E. coli* de la presente invención tiene la misma secuencia genómica en comparación con una cepa de *E. coli* de tipo silvestre, excepto por los genes de proteasa mutados específicos y opcionalmente un polinucleótido que codifica una proteína de interés.

Los ejemplos de mutaciones génicas implicadas en el metabolismo celular y la replicación de ADN que se usan comúnmente en cepas de *E. coli* en la materia, pero que no se usan en la célula de *E. coli* según la presente invención, incluyen *phoA*, *thiA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* y *pro*.

La expresión “tipo silvestre” en el contexto de la presente invención significa una cepa de una célula de *E. coli* como puede aparecer en la naturaleza o puede aislarse del entorno, que no porta ninguna mutación genomanipulada. Es un ejemplo de una cepa de tipo silvestre de *E. coli* W3110, tal como la cepa W3110 K-12 (F^- rph-1 INV(rrnD, rrnE) ilvG) (ATCC27325).

La célula de *E. coli* según el primer aspecto de la presente invención es isogénica de una célula W3110 de *E. coli* de tipo silvestre, excepto por el uno o más genes de proteasa mutados y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

- La célula de *E. coli* de la presente invención puede diferir adicionalmente de una célula de tipo silvestre por comprender un polinucleótido que codifica la proteína de interés. En esta realización, el polinucleótido que codifica la proteína de interés puede estar contenido en un vector de expresión adecuado transformado en la célula de *E. coli* y/o integrado en el genoma de la célula hospedadora de *E. coli*. En la realización en que el polinucleótido que codifica la proteína de interés se inserta en el genoma del hospedador, la célula de *E. coli* de la presente invención diferirá también de una célula de tipo silvestre debido a la secuencia polinucleotídica insertada que codifica la proteína de interés. Preferiblemente, el polinucleótido está en un vector de expresión en la célula de *E. coli*, causando así una desestabilización mínima del genoma de la célula hospedadora.
- En ciertas realizaciones de la presente invención, la célula de *E. coli* recombinante comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida. Como se usa en la presente memoria, "DegP" significa un gen que codifica la proteína DegP (también conocida como HtrA) que tiene función dual como chaperona y proteasa ("Families of serine peptidases"; Rawlings ND, Barrett AJ. *Methods Enzymol.* 1994; 244: 19-61). La secuencia del gen DegP no mutado se muestra en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de la proteína DegP no mutada se muestra en la SEQ ID NO: 8.
- A bajas temperaturas, la DegP funciona como chaperona y a altas temperaturas la DegP tiene preferencia por funcionar como proteasa ("A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein". *Cell*, volumen 97, publicación 3, páginas 339-347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) y "The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperaturas", Skorko-Glonek J et al *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658).
- En las realizaciones en que la célula de *E. coli* comprende la mutación de DegP, la mutación de DegP en la célula de *E. coli* proporciona un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona, pero no actividad proteasa completa.
- La expresión "que 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 en comparación con la proteína DegP no mutada de tipo silvestre. Preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene un 50 % o más, un 60 % o más, un 70 % o más, un 80 % o más, un 90 % o más o un 95 % o más de la actividad chaperona de una proteína DegP no mutada de tipo silvestre. Más preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene la misma actividad chaperona en comparación con DegP de tipo silvestre.
- La expresión "que tiene actividad proteasa reducida" en el contexto de la divulgación significa que la proteína DegP mutada no tiene la actividad proteasa completa en comparación con la proteína DegP no mutada de tipo silvestre. Preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene un 50 % o menos, un 40 % o menos, un 30 % o menos, un 20 % o menos, un 10 % o menos o un 5 % o menos de la actividad proteasa de una proteína DegP no mutada de tipo silvestre. Más preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que no tiene actividad proteasa.
- La célula de *E. coli* no es deficiente de DegP cromosómico, concretamente las secuencias del gen DegP no se han eliminado o mutado para prevenir la expresión de cualquier forma de proteína DegP.
- Puede introducirse cualquier mutación adecuada en el gen DegP para producir una proteína que tenga actividad chaperona y actividad proteasa reducida. La actividad proteasa y chaperona de una proteína DegP expresada a partir de una bacteria gramnegativa puede ensayarse fácilmente por un especialista en la materia mediante cualquier método adecuado tal como el método descrito en Spiess et al. en el que se ensayaron las actividades proteasa y chaperona de DegP en MalS, un sustrato natural de DegP ("A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein". *Cell*, volumen 97, publicación 3, páginas 339-347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) y también el método descrito en "The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperaturas", Skorko-Glonek J et al *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658.
- La DegP es una serinproteasa y tiene un centro activo consistente en una triada catalítica de residuos aminoácidos His105, Asp135 y Ser210 ("Families of serine peptidases", *Methods Enzymol.*, 1994, 244: 19-61 Rawlings N y Barrett A). La mutación de DegP para producir una proteína que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación con cambio de sentido, de uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210. Por consiguiente, el gen DegP mutado puede comprender:
- una mutación en His 105; o
 - una mutación en Asp135; o
 - una mutación en Ser210; o
 - una mutación en His105 y Asp135; o
 - una mutación en His105 y Ser210; o

- una mutación en Asp135 y Ser210; o
- una mutación en His105, Asp135 y Ser210.

Uno, dos o tres de His 105, Asp135 y Ser210 pueden mutarse a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad chaperona y actividad proteasa reducida. Por ejemplo, pueden mutarse uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 a un aminoácido pequeño tal como Gly o Ala. Es una mutación adecuada adicional cambiar uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 a un aminoácido que tenga propiedades opuestas tales como mutar Asp135 a Lys o Arg, mutar His105 polar a un aminoácido no polar tal como Gly, Ala, Val o Leu y mutar Ser210 hidrófilo pequeño a un residuo grande o hidrófobo tal como Val, Leu, Phe o Tyr. Preferiblemente, el gen DegP comprende la mutación puntual S210A, como se muestra en la Figura 1c, que se ha encontrado que produce una proteína que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa ("A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein". Cell, volumen 97, publicación 3, páginas 339-347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

La presente divulgación describe también una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, en la que el gen DegP comprende una mutación en His 105; o una mutación en Asp135; o una mutación en His105 y Asp135; o una mutación en His105 y Ser210; o una mutación en Asp135 y Ser210; o una mutación en His105, Asp135 y Ser210, como se discute anteriormente.

La DegP tiene dos dominios PDZ, PDZ1 (residuos 260-358) y PDZ2 (residuos 359-448), que median la interacción proteína-proteína ("A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein". Cell, volumen 97, publicación 3, páginas 339-347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M). En una realización de la presente invención, el gen degP se muta para eliminar el dominio PDZ1 y/o el dominio PDZ2. La delección de PDZ1 y PDZ2 da como resultado la pérdida completa de actividad proteasa de la proteína DegP y una actividad chaperona rebajada en comparación con la proteína DegP de tipo silvestre, mientras que la delección de cualquiera de PDZ1 o PDZ2 da como resultado un 5 % de actividad proteasa y actividad chaperona similar en comparación con la proteína DegP de tipo silvestre ("A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein". Cell, volumen 97, publicación 3, páginas 339-347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

El gen DegP mutado puede comprender también un sitio de restricción de origen no natural silencioso, tal como Ase I, para ayudar a los métodos de identificación y cribado, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1c.

La secuencia preferida del gen DegP mutado que comprende la mutación puntual S210A y un sitio marcador de restricción Ase I se proporciona en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia proteica codificada se muestra en la SEQ ID NO: 10. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia de DegP mutada de SEQ ID NO: 9 se muestran en la Figura 1c.

En las realizaciones de la presente invención en las que la célula de E. coli comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, una o más de las células de E. coli proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un rendimiento mejorado de proteínas plegadas correctamente a partir de la célula respecto a células mutadas en las que el gen DegP se ha mutado para desactivar génicamente DegP previniendo la expresión de DegP, tal como DegP cromosómico deficiente. En una célula que comprende un gen DegP mutado por desactivación génica que previene la expresión de DegP, la actividad chaperona de DegP se pierde completamente, mientras que en la célula de E. coli según una realización de la presente invención se retiene la actividad chaperona de DegP mientras que se pierde la actividad proteasa total. En estas realizaciones, una o más células de E. coli según la presente invención tienen una menor actividad proteasa para prevenir la proteólisis de la proteína mientras mantienen la actividad chaperona para permitir un plegado y transporte correctos de la proteína en la célula hospedadora.

El especialista en la materia será capaz de ensayar fácilmente proteína secretada para ver si la proteína está plegada correctamente usando métodos bien conocidos en la materia, tales como HPLC de proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medida de afinidad de epítipo.

En estas realizaciones, una o más células de E. coli según la presente invención pueden tener un crecimiento celular mejorado en comparación con células portadoras de un gen DegP mutado con desactivación génica que previene la expresión de DegP. Sin desear limitarse por la teoría, el crecimiento celular mejorado puede exhibirse debido a que la proteasa DegP retiene actividad chaperona que puede aumentar la capacidad de la célula de procesar todas las proteínas que requieren actividad chaperona. Por consiguiente, la producción de proteínas plegadas correctamente necesarias para el crecimiento y reproducción celular puede aumentarse en una o más de las células de E. coli de la presente invención en comparación con células portadoras de una mutación de desactivación génica de DegP, mejorando así las rutas celulares que regulan el crecimiento. Adicionalmente, las cepas deficientes en proteasa DegP conocidas son generalmente sensibles a la temperatura y no crecen típicamente a temperaturas mayores de aproximadamente 28 °C. Sin embargo, las células de E. coli según la presente invención no son sensibles a la temperatura y pueden crecer a temperaturas de 28 °C o mayores, incluyendo temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C, que se usan típicamente para la producción a escala industrial de proteínas a partir de

bacterias.

La presente divulgación describe también células bacterianas gramnegativas que comprenden un gen ptr mutado por desactivación génica. Como se usa en la presente memoria, "gen ptr" significa un gen que codifica proteasa III, una proteasa que degrada proteínas de alto peso molecular. La secuencia del gen ptr no mutado se muestra en la SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la proteína proteasa III no mutada se muestra en la SEQ ID NO: 5.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la célula de *E. coli* recombinante comprende un gen Tsp mutado por desactivación génica. Como se usa en la presente memoria, "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 de unión a penicilina 3 (PBP3) y proteínas de cola de fago. La secuencia del gen Tsp no mutado se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la proteína Tsp no mutada se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Un gen ptr mutado puede codificar una proteasa III que tiene un 50 % o menos, un 40 % o menos, un 30 % o menos, un 20 % o menos, un 10 % o menos o un 5 % o menos de la actividad proteasa de una proteína proteasa III no mutada de tipo silvestre. Más preferiblemente, el gen ptr mutado codifica una proteína proteasa III que no tiene actividad proteasa. En esta realización, la célula de *E. coli* no es deficiente en ptr cromosómico, concretamente la secuencia del gen ptr no se ha eliminado ni mutado para prevenir la expresión de cualquier forma de proteína proteasa III.

Puede introducirse cualquier mutación adecuada en el gen ptr para producir una proteína proteasa III que tiene actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína proteasa III expresada a partir de una bacteria gramnegativa puede ensayarse fácilmente por un especialista en la materia mediante cualquier método adecuado en la materia.

En el primer aspecto de la presente invención, el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos, un 40 % o menos, un 30 % o menos, un 20 % o menos, un 10 % o menos o un 5 % o menos de la actividad proteasa de una proteína Tsp no mutada de tipo silvestre. Más preferiblemente, el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que no tiene actividad proteasa. En esta realización, la célula de *E. coli* no es deficiente en Tsp cromosómico, concretamente la secuencia del gen Tsp no se ha eliminado ni mutado para prevenir la expresión de cualquier forma de proteína Tsp.

Puede introducirse en el gen Tsp cualquier mutación adecuada para producir una proteína que tiene actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína Tsp expresada a partir de una bacteria gramnegativa puede ensayarse fácilmente por un especialista en la materia mediante cualquier método adecuado en la materia, tal como el método descrito en Keiler et al ("Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 270, No. 48, publicación de 1 de diciembre, pág. 28864-28868, 1995 Kenneth C. Keiler y Robert T. Sauer) en el que se ensayaron las actividades proteasa de Tsp.

Se ha reseñado en Keiler et al (*supra*) que Tsp tiene un sitio activo que comprende los residuos S430, D441 y K455 y los residuos G375, G376, E433 y T452 son importantes para mantener la estructura de Tsp. Keiler et al (*supra*) reseña los hallazgos de que los genes de Tsp mutados S430A, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A no tenían actividad proteasa detectable. Se reseña adicionalmente que el gen Tsp mutado con S430C presentaba aproximadamente un 5-10 % de actividad de tipo silvestre. Por consiguiente, la mutación de Tsp para producir una proteína que tenga actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación con cambio de sentido, en uno más de los residuos S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452. Preferiblemente, la mutación de Tsp para producir una proteína que tenga actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación con cambio de sentido, de uno, dos o los tres residuos de sitio activo S430, D441 y K455.

Según el gen Tsp mutado puede comprender:

- una mutación en S430; o
- una mutación en D441; o
- una mutación en K455; o
- una mutación en S430 y D441; o
- una mutación en S430 y K455; o
- una mutación en D441 y K455; o
- una mutación en S430, D441 y K455.

Uno o más de S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452 puede mutarse a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad proteasa reducida. Son ejemplos de mutaciones adecuadas S430A, S430C, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A. El gen Tsp mutado puede

comprender una, dos o tres mutaciones en los residuos de sitio activo, por ejemplo, el gen puede comprender:

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

5 Preferiblemente, el gen Tsp comprende la mutación puntual S430A o S430C.

En el primer aspecto de la presente invención, la expresión “gen ptr mutado por desactivación génica” y “gen Tsp mutado por desactivación génica” en el contexto de la presente invención significa que el gen comprende una o más mutaciones, causando así que la no expresión de la proteína codificada por el gen proporcione una célula *E. coli* deficiente en la proteína codificada por el gen mutado por desactivación génica. El gen desactivado génicamente puede transcribirse parcial o completamente, pero no se traduce a la proteína codificada.

El gen ptr mutado por desactivación génica y/o gen Tsp mutado por desactivación génica puede mutarse de cualquier modo adecuado, por ejemplo por una o más de mutaciones de delección, inserción, puntual, cambio de sentido, sin sentido y de desplazamiento de marco, causando la no expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen puede desactivarse génicamente por inserción de una secuencia de ADN extraña, tal como un marcador de resistencia a antibiótico, en la secuencia de codificación del gen.

En una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el gen no se muta por inserción de una secuencia de ADN extraña, tal como un marcador de resistencia a antibiótico, en la secuencia de codificación del gen. Preferiblemente, el gen Tsp y/o el gen de proteasa III comprenden una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen, previniendo así la expresión de la proteína Tsp y/o de la proteína proteasa III.

La célula según el segundo aspecto de la divulgación comprende mutaciones de desactivación génica de Tsp y/o proteasa III donde el gen Tsp y el gen de proteasa III comprenden una mutación en el codón de iniciación del gen y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen, previniendo así la expresión de la proteína Tsp y/o la proteína proteasa III.

Una mutación en el codón de iniciación del gen de desactivación génica diana causa pérdida de función del codón de iniciación y asegura así que el gen diana no comprenda un sitio de iniciación adecuado al inicio de la secuencia de codificación. La mutación en el codón de iniciación puede ser una mutación de cambio de sentido de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de iniciación. Como alternativa, o adicionalmente, el codón de iniciación puede mutarse por una mutación de desplazamiento de marco de inserción o delección.

El gen ptr y el gen Tsp comprenden cada uno un codón de iniciación ATG. Si el gen comprende más de un codón de iniciación colocado adecuadamente, como se encuentra en el gen Tsp en que están presentes dos codones ATG en el extremo 5' de la secuencia de codificación, uno o ambos de los codones ATG pueden estar mutados con una mutación con cambio de sentido.

En una realización preferida, el gen ptr se muta para cambiar el codón de iniciación ATG a ATT, como se muestra en la Figura 1a. En una realización preferida, el gen Tsp se muta en el segundo codón ATG (codón 3) a TCG, como se muestra en la Figura 1b.

El gen ptr mutado por desactivación génica y/o el gen Tsp mutado por desactivación génica pueden comprender como alternativa o adicionalmente uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación del gen y en dirección 5' del codón de terminación del gen. Preferiblemente, el gen ptr mutado por desactivación génica y/o el gen Tsp mutado por desactivación génica comprenden ambos una mutación con cambio de sentido del codón de iniciación y uno o más codones de terminación insertados.

El uno o más codones de terminación insertados son preferiblemente codones de terminación en marco. Sin embargo, el uno o más codones de terminación insertados pueden ser como alternativa o adicionalmente codones de terminación fuera de marco. Pueden requerirse uno o más codones de terminación fuera de marco para terminar la traducción cuando un codón de iniciación fuera de marco se cambia a un codón de iniciación en marco por la inserción o delección de una mutación de desplazamiento de marco. El uno o más codones de terminación pueden introducirse mediante cualquier mutación adecuada incluyendo una mutación puntual con cambio de sentido y una mutación con desplazamiento de fase. Los uno o más codones de terminación se introducen preferiblemente por una mutación de desplazamiento de fase y/o una mutación de inserción, preferiblemente mediante el reemplazo de un segmento de la secuencia génica por una secuencia que comprende un codón de terminación. Por ejemplo, puede insertarse un sitio de restricción *Ase I* que comprende el codón de terminación TAA.

En una realización preferida, se muta el gen ptr para insertar un codón de terminación en marco mediante inserción de un sitio de restricción *Ase I*, como se muestra en la Figura 1a.

En una realización preferida, se muta el gen Tsp para eliminar “T” del quinto codón, causando así un desplazamiento

de marco que da como resultado codones de terminación en los codones 11 y 16, como se muestra en la Figura 1b. En una realización preferida, se muta el gen Tsp para insertar un sitio de restricción Ase I para crear un tercer codón de terminación en marco en el codón 21, como se muestra en la Figura 1b.

En una realización preferida, el gen ptr mutado por desactivación génica tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia del gen ptr mutado por desactivación génica de SEQ ID NO: 6 se muestran en la Figura 1a.

En una realización preferida, el gen Tsp mutado por desactivación génica tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3, que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT en dirección 5' del codón de iniciación. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia de Tsp mutada por desactivación génica de SEQ ID NO: 3 se muestran en la Figura 1b. En una realización, el gen Tsp mutado tiene la secuencia de ADN de nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO: 3.

Las mutaciones por desactivación génica descritas anteriormente son ventajosas porque causan una desestabilización mínima o nula del ADN cromosómico en dirección 5' o en dirección 3' del sitio del gen de desactivación génica diana y no requieren la inserción y retención de ADN extraño, tal como marcadores de resistencia a antibióticos, que pueden afectar a la aptitud de la célula para expresar una proteína de interés, particularmente proteínas terapéuticas. Por consiguiente, una o más de las células de E. coli según la presente invención pueden exhibir características de crecimiento y/o expresión de proteína mejoradas en comparación con células en las que el gen de proteasa se ha desactivado génicamente por inserción de ADN extraño en la secuencia que codifica el gen.

Muchas mutaciones genomanipuladas, incluyendo mutaciones de desactivación génica, implican el uso de marcadores de resistencia a antibiótico que permiten la selección e identificación de células mutadas exitosamente. Sin embargo, como se discute anteriormente, hay una serie de desventajas al usar marcadores de resistencia a antibióticos.

Una realización adicional de la presente invención supera las desventajas anteriores de usar marcadores de resistencia a antibiótico en la que los genes de proteasa mutados seleccionados de uno o más de un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa; un gen ptr mutado que codifica proteasa IIII y un gen Tsp mutado que codifica proteasa Tsp se mutan para comprender uno o más sitios marcadores de restricción. Los sitios de restricción se genomanipulan en el gen y no son de origen natural. Los sitios marcadores de restricción son ventajosos porque permiten el cribado e identificación de células modificadas correctamente que comprenden las mutaciones cromosómicas requeridas. Las células que se han modificado para portar uno o más de los genes de proteasa mutados pueden analizarse por PCR de ADN genómico de lisados celulares usando pares oligonucleotídicos diseñados para amplificar una región del ADN genómico que comprende un sitio marcador de restricción de origen no natural. El ADN amplificado puede analizarse entonces por electroforesis en gel de agarosa antes y después de incubación con una enzima de restricción adecuada capaz de digerir el ADN en el sitio marcador de restricción de origen no natural. La presencia de fragmentos de ADN después de incubación con la enzima de restricción confirma que las células se han modificado exitosamente para portar el uno o más genes de proteasa mutados.

En la realización en la que el gen ptr mutado por desactivación génica tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6, las secuencias cebadoras oligonucleotídicas mostradas en la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18 pueden usarse para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural a partir del ADN genómico de células de E. coli transformadas. El ADN genómico amplificado puede incubarse entonces con la enzima de restricción Ase I y analizarse por electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen ptr mutado en el ADN genómico.

En la realización en la que el gen Tsp mutado por desactivación génica tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3 o los nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO: 3, las secuencias cebadoras oligonucleotídicas mostradas en la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16 pueden usarse para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural a partir del ADN genómico de células de E. coli transformadas. El ADN genómico amplificado puede incubarse entonces con enzima de restricción Ase I y analizarse por electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen Tsp mutado en el ADN genómico.

En la realización en la que el gen DegP mutado tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 9, las secuencias cebadoras oligonucleotídicas mostradas en la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20 pueden usarse para amplificar la región de ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural a partir del ADN genómico de células de E. coli transformadas. El ADN genómico amplificado puede incubarse entonces con enzima de restricción Ase I y analizarse por electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen DegP mutado en el ADN genómico.

El uno o más sitios de restricción pueden introducirse mediante cualquier mutación adecuada incluyendo mediante una o más mutaciones de delección, inserción, puntual, con cambio de sentido, sin sentido y con desplazamiento de marco. Puede introducirse un sitio de restricción mediante la mutación en el codón de iniciación y/o la mutación para introducir el uno o más codones de terminación, como se describe anteriormente. Esta realización es ventajosa porque el sitio marcador de restricción es un marcador directo y único de las mutaciones por desactivación génica

introducidas.

Puede insertarse un sitio marcador de restricción que comprende un codón de terminación en marco, tal como un sitio de restricción *Ase I*. Esto es particularmente ventajoso porque el sitio de restricción insertado sirve tanto como sitio marcador de restricción como codón de terminación para prevenir la transcripción completa de la secuencia codificante del gen. Por ejemplo, en la realización en la que se introduce un codón de terminación en el gen *ptr* mediante la introducción de un sitio *Ase I*, esto crea también un sitio de restricción, como se muestra en la Figura 1a. Por ejemplo, en la realización en la que se introduce un codón de terminación en el gen *Tsp* en el codón 21 mediante la introducción de un sitio *Ase I*, esto crea también un sitio de restricción como se muestra en la Figura 1b.

Puede insertarse un sitio marcador de restricción mediante la mutación en el codón de iniciación y opcionalmente una o más mutaciones puntuales adicionales. En esta realización, el sitio marcador de restricción es preferiblemente un sitio de restricción *EcoR I*. Esto es particularmente ventajoso porque la mutación en el codón de iniciación crea también un sitio marcador de restricción. Por ejemplo, en la realización en la que el codón de iniciación del gen *ptr* se cambia a ATT, esto crea un sitio marcador *EcoR I*, como se muestra en la Figura 1a. Por ejemplo, en la realización en la que el codón de iniciación (codón 3) del gen *Tsp* se cambia de ATG a TCG, como se muestra en la Figura 1b, una mutación puntual adicional del codón 2 de AAC a ATT y la mutación en el codón 3 de ATG a TCG crea un sitio marcador de restricción *EcoR I*, como se muestra en la Figura 1b.

En el gen *DegP*, puede introducirse un sitio de restricción marcador usando cambios de codón silenciosos. Por ejemplo, puede usarse un sitio *Ase I* como sitio marcador de restricción silencioso, en el que el codón de terminación TAA está fuera de marco, como se muestra en la Figura 1c.

En las realizaciones de la presente invención en las que el gen *ptr* y/o el gen *Tsp* se mutan para codificar una proteasa III o *Tsp* que tiene actividad proteasa reducida, pueden introducirse uno o más sitios de restricción marcadores usando cambios de codón silenciosos.

La célula de *E. coli* recombinante según la presente invención puede producirse mediante cualquier medio adecuado. El especialista en la materia conoce técnicas adecuadas que pueden usarse para reemplazar una secuencia génica cromosómica por una secuencia génica mutada. Pueden emplearse vectores adecuados que permitan la integración en el cromosoma hospedador por recombinación homóloga.

Se describen métodos de reemplazo génico adecuados, por ejemplo, en Hamilton et al. ("New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in *Escherichia coli*", Hamilton C. M. et al., *Journal of Bacteriology* Septiembre de 1989, Vol. 171, No. 9, pág. 4617-4622), Skorupski et al. ("Positive selection vectors for allelic Exchange", Skorupski K y Taylor R. K., *Gene*, 1996, 169, 47-52), Kiel et al. ("A general method for the construction of *Escherichia coli* mutants by homologous recombination and plasmid segregation", Kiel J.A.K.W. et al, *Mol Gen Genet* 1987, 207: 294-301), Blomfield et al. ("Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature sensitive pSC101 replicon", Blomfield I.C. et al., *Molecular Microbiology* 1991, 5(6), 1447-1457) y Ried et al. ("An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis", Ried J. L. y Collmer A., *Gene* 57 (1987) 239-246). Es un plásmido adecuado que posibilita una recombinación/reemplazo homólogo el plásmido pKO3 (Link et al., 1997, *Journal of Bacteriology*, 179, 6228-6237).

Pueden identificarse cepas mutadas exitosamente usando métodos bien conocidos en la materia, incluyendo secuenciación de ADN por PCR de colonia y cartografía por enzimas de restricción de PCR de colonia.

En la realización en la que la célula de *E. coli* comprende dos o tres de los genes de proteasa mutados, puede introducirse la proteasa mutada en la célula de *E. coli* en el mismo o diferentes vectores.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE001 que tiene el genotipo ΔTsp y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13444.

Además, se divulga una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE002 que tiene genotipo Δptr y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13445.

Además, se divulga una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE003 que tiene genotipo *DegP* S210A y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13446.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE004 que tiene genotipo $\Delta Tsp \Delta ptr$ y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13447.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE005 que tiene genotipo ΔTsp , *DegP* S210A y depositada el 12 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13448.

Además, se divulga una célula de *E. coli* mutante de cepa MXE006 que tiene genotipo Δptr , DegP S210A y depositada el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13449.

5 En una realización, la célula de *E. coli* según la presente invención no porta un gen *ompT* mutado por desactivación génica, tal como es deficiente en *ompT* cromosómico. En una realización, la célula de *E. coli* según la presente invención no porta ningún gen de proteasa mutado por desactivación génica adicional.

10 La célula de *E. coli* según la presente invención puede comprender además una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés. La secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés puede ser exógena o endógena. La secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés puede estar integrada en el cromosoma del hospedador o puede no estar no integrada en un vector, típicamente un plásmido.

En una realización, la célula de *E. coli* según la presente invención expresa una proteína de interés. "Proteína de interés" en el contexto de la presente memoria descriptiva pretende hacer referencia a un polipéptido para expresión, habitualmente un polipéptido recombinante. Sin embargo, la proteína de interés puede ser una proteína endógena expresada a partir de un gen endógeno en la célula hospedadora de *E. coli*.

15 Como se usa en la presente memoria, un "polipéptido recombinante" hace referencia a una proteína que se construye o produce usando tecnología de ADN recombinante. La proteína de interés puede ser una secuencia exógena idéntica a la proteína endógena o una versión mutada de la misma, por ejemplo con actividad biológica atenuada, o fragmento de la misma, expresada a partir de un vector exógeno. Como alternativa, la proteína de interés puede ser una proteína heteróloga, no expresada normalmente por la célula de hospedadora de *E. coli*.

20 La proteína de interés puede ser cualquier proteína adecuada, incluyendo una proteína terapéutica, profiláctica o de diagnóstico.

En una realización, la proteína de interés es útil en el tratamiento de enfermedades o trastorno que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunitarios y trastornos fibróticos y cánceres.

25 La expresión "enfermedad o trastorno inflamatorio" y "enfermedad o trastorno inmunitario" incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LSE (lupus sistémico eritematoso), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes sacarina de tipo I, trasplante y enfermedad de injerto contra el hospedador.

30 La expresión "trastorno fibrótico" incluye fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerosis sistémica (o escleroderma), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía de IgA, hipertensión, enfermedad renal de etapa terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macular relacionada con la edad (DMRA), retinopatía, fibrosis reactiva cardíaca, cicatrización, queloides, quemaduras, úlceras cutáneas, angioplastia, cirugía de derivación coronaria, artroplastia y cirugía de cataratas.

35 El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, encontrado en piel o, más comúnmente, el revestimiento de órganos corporales, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en tejido adyacente y extenderse (metastatizarse) a órganos distantes, por ejemplo a hueso, hígado, pulmón o cerebro.

40 La proteína puede ser un polipéptido sensible proteolíticamente, concretamente proteínas que tienden a escindir, susceptibles de escindir o escindidas por una o más proteasas bacterianas gramnegativas, tales como de *E. coli*, en estado nativo o durante la secreción. En una realización, la proteína de interés es sensible proteolíticamente a una proteasa seleccionada de DegP, proteasa III y Tsp. En una realización, la proteína de interés es sensible proteolíticamente a las proteasas DegP y proteasa III. En una realización, la proteína de interés es sensible proteolíticamente a las proteasas DegP y Tsp. En una realización, la proteína de interés es sensible proteolíticamente a las proteasas Tsp y proteasa III. En una realización, la proteína de interés es sensible proteolíticamente a las proteasas DegP, proteasa III y Tsp.

45 Preferiblemente, la proteína es un polipéptido eucariótico.

50 La proteína de interés expresada por las células de *E. coli* según la invención pueden ser, por ejemplo, un inmunógeno, una proteína de fusión que comprende dos proteínas heterólogas o un anticuerpo. Los anticuerpos para uso como proteína de interés incluyen anticuerpos monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados, totalmente humanos o quiméricos. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, pero deriva preferiblemente de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano o un fragmento humanizado. El anticuerpo puede derivar de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina y puede obtenerse de cualquier especie, incluyendo por ejemplo ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Pueden obtenerse partes del fragmento de anticuerpo a partir de una o más especies, por ejemplo los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra.

El anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras completas o un fragmento de las mismas, p. ej. VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmento scFv, Fab-Fv o un anticuerpo de especificidad dual, tal como un Fab-dAb, como se describe en el documento PCT/GB2008/003331.

El anticuerpo puede ser específico de cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a célula, por ejemplo una proteína de superficie celular sobre células tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés pueden ser también cualquier proteína médicamente relevante tal como aquellas proteínas reguladas positivamente durante enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos particulares de proteínas de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas β 1, p. ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o receptor de CSF1, DPCR1, DPCR1, dudulina 2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, similar a nectina 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y MHC de clase II, KDR y VEGF y, cuando sea apropiado, receptores de las mismas.

Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos víricos, por ejemplo antígenos de virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (anteriormente conocido como factor de necrosis tumoral α), factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como as G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como de la gripe, EBV, Hep A, B y C, agente de bioterrorismo, radionucleidos y metales pesados y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En una realización, el anticuerpo puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

En una realización preferida, la proteína de interés expresada por las células de *E. coli* según la presente invención es un anticuerpo anti-TNF, más preferiblemente un Fab' anti-TNF, como se describe en el documento WO01/094585.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tiene especificidad por TNF humano (anteriormente conocido como TNF α), en el que la cadena ligera comprende la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y la cadena pesada comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo que tiene especificidad por TNF humano es un Fab' y tiene una secuencia de cadena ligera que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 13 y una secuencia de cadena pesada que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 14.

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que el rendimiento de Fab puede mejorarse mediante expresión en una o más células de *E. coli* según la presente invención. Sin desear limitarse por la teoría, el gen DegP mutado usado en las cepas de *E. coli* de la presente invención que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida mejora el rendimiento de Fab porque la actividad chaperona de DegP facilita el plegamiento correcto de Fab.

Después de la expresión, los fragmentos de anticuerpo pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo por conjugación con otra entidad tal como una molécula efectora.

La expresión molécula efectora como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de la mismas, p. ej. ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros de origen sintético o natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que puedan detectarse por espectroscopía por RMN o REE. Las moléculas efectoras pueden enlazarse con el anticuerpo o fragmento del mismo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo un fragmento de anticuerpo puede modificarse para enlazar al menos una molécula efectora como se describe en los documentos WO05/003171 o WO05/003170. Los documentos WO05/003171 o WO05/003170 describen también moléculas efectoras adecuadas.

En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo, tal como un Fab, se PEGila para generar un producto con las propiedades requeridas, por ejemplo similares a los anticuerpos enteros, si se requiere. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un Fab' anti-TNF α PEGilado como se describe en el documento WO01/094585, que tiene

preferiblemente enlazado en uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo derivado de lisilmaleimida, en el que cada uno de los dos grupos amino del residuo de lisilo tiene ligado covalentemente al mismo un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da, de tal modo que el peso molecular medio total de los residuos de metoxipoli(etilenglicol) sea de aproximadamente 40.000 Da, más preferiblemente el grupo derivado de lisilmaleimida es [1-[[[2-[[3-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxopropil]amino]etil]amino]carbonil]-1,5-pentanodil]bis(iminocarbonilo).

La célula de E. coli puede comprender también secuencias polinucleotídicas adicionales que codifican una o más proteínas de interés adicionales.

El polinucleótido que codifica la proteína de interés puede expresarse como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser una reconocida y procesada por la célula hospedadora de E. coli. Para células hospedadoras de E. coli que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativa o de polipéptido eucariótico, se sustituye la secuencia señal por una secuencia señal procariótica. Las secuencias señal adecuadas incluyen OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA y DsbC.

En una realización, se emplea un módulo de expresión en la presente invención para portar el polinucleótido que codifica la proteína de interés que comprende típicamente una o más secuencias codificantes de proteína que codifican una o más proteínas de interés y una o más secuencias reguladoras de expresión. La una o más secuencias reguladoras de expresión pueden incluir un promotor. La una o más secuencias reguladoras de expresión pueden incluir también una región 3' no traducida tal como una secuencia de terminación. Se discuten promotores adecuados con más detalle a continuación.

En una realización, la célula de E. coli según la presente invención comprende un vector, tal como un plásmido. El vector comprende preferiblemente uno o más módulos de expresión como se definen anteriormente.

El vector para uso en la presente invención puede producirse insertando un módulo de expresión como se define anteriormente en un vector adecuado. Como alternativa, las secuencias reguladoras de expresión para dirigir la expresión de la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés pueden estar contenidas en el vector y por tanto puede requerirse solo la región codificante del polinucleótido para completar el vector.

Los ejemplos de vectores que pueden emplearse para transformar la célula hospedadora de E. coli 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.

Están disponibles muchas formas de vector de expresión. Tales vectores comprenden habitualmente un origen de replicación de ADN de plásmido, un marcador seleccionable de 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 ribosoma.

Los promotores empleados en la presente invención pueden ligarse con el polinucleótido relevante directamente o como alternativa localizarse en una posición apropiada, por ejemplo en un vector tal que, cuando se inserta el polipéptido relevante, el promotor relevante pueda actuar sobre el mismo. En una realización, el promotor se localiza antes de la porción codificante del polinucleótido sobre el que actúa, por ejemplo un promotor relevante antes de cada porción codificante de polinucleótido. "Antes" como se usa en la presente memoria pretende implicar que el promotor está localizado en el extremo 5' con respecto a la porción polinucleotídica codificante.

Los promotores pueden ser endógenos o exógenos de las células hospedadoras de E. coli. Los promotores adecuados incluyen Lac, tac, trp, PhoA, lpp, Arab, Tet y T7.

Uno o más promotores empleados pueden ser promotores inducibles.

Las unidades de expresión para uso en sistemas bacterianos contienen generalmente también una secuencia ribosómica de Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operativamente con el ADN codificante del polipéptido de interés.

En las realizaciones de la presente invención en las que una secuencia polinucleotídica comprende dos o más secuencias codificantes de dos o más proteínas de interés, por ejemplo una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, la secuencia polinucleotídica puede comprender una o más secuencias de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permiten la iniciación de la traducción en el medio de un ARNm. Una secuencia de IRES puede estar situada entre secuencias polinucleotídicas codificantes para potenciar la traducción separada del ARNm produciendo las secuencias polipeptídicas codificadas.

Los terminadores pueden ser endógenos o exógenos de las células hospedadoras de E. coli. Es un terminador

adecuado rrmB.

Pueden encontrarse reguladores transcripcionales adecuados adicionales, incluyendo promotores y terminadores y métodos de orientación a proteína, en "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli" Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, Septiembre de 1996, pág. 512-538.

- 5 Las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria con referencia al polinucleótido se aplican igualmente a realizaciones alternativas de la invención, por ejemplo vectores, módulos de expresión y/o células hospedadoras de E. coli que comprenden los componentes empleados en las mismas, siempre que el aspecto relevante pueda aplicarse a las mismas.

- 10 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una proteína de interés recombinante que comprende expresar la proteína de interés recombinante en una célula de E. coli recombinante de la presente invención.

La célula de E. coli y proteína de interés empleadas preferiblemente en el método de la presente invención se describen con detalle anteriormente.

- 15 Cuando el polinucleótido codificante de la proteína de interés es exógena, el polinucleótido puede incorporarse a la célula hospedadora de E. coli usando cualquier medio adecuado conocido en la materia. Típicamente, el polinucleótido se incorpora como parte de un vector de expresión que se transforma en la célula de E. coli. Por consiguiente, en un aspecto la célula de E. coli según la presente invención comprende un módulo de expresión que comprende el polinucleótido codificante de la proteína de interés.

- 20 La secuencia polinucleotídica puede transformarse en una célula usando técnicas estándares, por ejemplo empleado cloruro de rubidio, PEG o electroporación.

- 25 El método según la presente invención puede emplear también un sistema de selección para facilitar la selección de células de E. coli estables que se han transformado exitosamente con el polinucleótido codificante de la proteína de interés. El sistema de selección emplea típicamente la cotransformación de una secuencia polinucleotídica codificante de un marcador de selección. En una realización, cada polinucleótido transformado en la célula de E. coli comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más marcadores de selección. Por consiguiente, la transformación de polinucleótido que codifica la proteína de interés y el uno o más polinucleótidos que codifican el marcador ocurre conjuntamente y el sistema de selección puede emplearse para seleccionar aquellas células de E. coli que producen las proteínas deseadas.

- 30 Las células capaces de expresar el uno o más marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en ciertas condiciones impuestas artificialmente, por ejemplo la adición de una toxina o antibiótico, debido a las propiedades dotadas por el componente polipeptídico/génico o polipeptídico del sistema de selección incorporado a las mismas (p. ej., resistencia a antibiótico). Aquellas células que no pueden expresar el uno o más marcadores no son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas artificialmente. Las condiciones impuestas artificialmente pueden elegirse para ser más o menos rigurosas, según se requiera.

- 35 Puede emplearse cualquier sistema de selección adecuado en la presente invención. Típicamente, el sistema de selección puede estar basado en la inclusión en el vector de uno o más genes que proporcionen resistencia a un antibiótico conocido, por ejemplo un gen de resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina o ampicilina. Pueden seleccionarse las células de E. coli que crecen en presencia de un antibiótico relevante, ya que expresan tanto el gen que da resistencia al antibiótico como la proteína deseada.

- 40 En una realización, el método según la presente invención comprende además la etapa de cultivar la célula de E. coli transformada en un medio para expresar así la proteína de interés.

Puede usarse un sistema de expresión inducible o un promotor constitutivo en la presente invención para expresar la proteína de interés. Los sistemas de expresión inducibles y promotores constitutivos son bien conocidos en la materia.

- 45 Puede usarse cualquier medio adecuado para cultivar la célula de E. coli transformada. El medio puede adaptarse para un sistema de selección específico, por ejemplo el medio puede comprender un antibiótico para permitir que solo aquellas células de E. coli que se hayan transformado exitosamente crezcan en el medio.

- 50 Las células de E. coli obtenidas a partir del medio pueden someterse a cribado y/o purificación adicional según se requiera. El método puede comprender además una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés según se requiera.

El polipéptido puede recuperarse de la cepa, incluyendo del citoplasma, periplasma o medio de cultivo.

El método o métodos específicos usados para purificar una proteína dependen del tipo de proteína. Los métodos adecuados incluyen fraccionamiento en columnas de inmutaoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía en sílice; cromatografía en una resina

de intercambio iónico tal como S-SEPHAROSE y DEAE; cromatofoco; precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel.

Los anticuerpos pueden separarse adecuadamente del medio de cultivo y/o extracto de citoplasma y/o extracto de periplasma mediante procedimientos de purificación de anticuerpo convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de proteína G, cromatografía de proteína L, resinas en modo mixto tiofilicas, marcaje His, marcaje FLAG, cromatografía de hidroxapatito, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad, fraccionamiento/precipitación con sulfato de amonio, etanol o PEG, membranas de intercambio iónico, cromatografía de adsorción de lecho expandido (EBA) o cromatografía de lecho móvil simulado.

El método puede incluir también una etapa adicional de medida de la cantidad de expresión de la proteína de interés y selección de las células de *E. coli* que tienen altos niveles de expresión de la proteína de interés.

Pueden efectuarse una o más etapas de método descritas en la presente memoria en combinación en un recipiente adecuado tal como un biorreactor.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación de cepas de células de *E. coli* mutantes

La cepa de célula hospedadora usada era W3110 de genotipo: F- LAM-IN (rrnD-rrnE)1 rph1 (ATCC nº 27325).

W3110A, como se muestra en las figuras, es un lote diferente de W3110.

Se generaron las siguientes cepas de células de *E. coli* mutantes usando un sistema de vector de reemplazo génico que usa el plásmido de recombinación/reemplazo homólogo pKO3 (Link et al., 1997, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237).

Cepa de célula de <i>E. coli</i> mutante	Genotipo
MXE001	Δ Tsp
MXE004	Δ Tsp, Δ proteasa III
MXE005	Δ Tsp, DegP S210A

Se depositó la cepa MXE001 el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13444.

Se depositó la cepa MXE004 el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13447.

Se depositó la cepa MXE005 el 21 de mayo de 2009 en la National Collection of Type Cultures, HPA, Reino Unido, con número de acceso NCTC13448.

Se desplazaron los módulos de integración de Tsp, proteasa III y DegP como fragmentos de restricción de Sal I, Not I a plásmidos pKO3 de restricción similar.

El plásmido usa el mutante sensible a la temperatura del origen de replicación de pSC101 (*RepA*) junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar eventos de integración cromosómica. El gen *sacB* que codifica levansucrasa es letal para *E. coli* crecida en sacarosa y, por ello se usa (junto con el marcador de cloranfenicol y el origen de pSC101) para forzar y seleccionar eventos de desintegración y curación de plásmido. Esta metodología se ha descrito anteriormente (Hamilton et al., 1989, Journal of Bacteriology, 171, 4617-4622 y Blomfield et al., 1991, Molecular Microbiology, 5, 1447-1457). El sistema pKO3 retira todos los marcadores selectivos del genoma hospedador excepto del gen insertado.

Se construyeron los siguientes plásmidos.

pMXE191 que comprende el gen Tsp mutado por desactivación génica como se muestra en la SEQ ID NO: 3 que comprende los marcadores de restricción *EcoR* I y *Ase* I.

pMXE192 que comprende el gen de proteasa III mutado por desactivación génica como se muestra en la SEQ ID NO: 6 que comprende los marcadores de restricción *EcoR* I y *Ase* I.

pMXE192 que comprende el gen DegP mutado como se muestra en la SEQ ID NO: 9 que comprende un *Ase* I.

Se transformaron entonces estos plásmidos en células W3110 de *E. coli* químicamente competentes preparadas usando el método encontrado en Chung CT et al. "Transformation and storage of bacterial cells in the same

solution". PNAS 86: 2172-2175 (1989).

Día 1. Se mezclaron 40 µl de células de *E. coli* con 1 µl (10 pg) de ADN de pKO3 en una cubeta de electroporación BioRad enfriada de 0,2 cm antes de electroporación a 2500 V, 25 µF y 200 Ω. Se añadieron 1000 µl de 2xPY inmediatamente y se recuperaron las células por agitación a 250 rpm en una incubadora a 30 °C durante 1 hora. Se diluyeron las células en serie 1/10 en 2xPY antes de sembrar alícuotas de 100 µl sobre placas de agar 2xPY que contenía cloranfenicol 20 µg/ml precalentadas a 30 °C y 43 °C. Se incubaron las placas durante una noche a 30 °C y 43 °C.

Día 2. El número de colonias crecidas a 30 °C daba una estimación de la eficacia de electroporación, mientras que las colonias que sobreviven al crecimiento a 43 °C representan eventos de integración potenciales. Se eligieron colonias individuales de la placa de 43 °C y se resuspendieron en 10 ml de 2xPY. Se sembraron 100 µl de esto en placas de agar 2xPY que contenían sacarosa al 5 % (p/v) precalentadas a 30 °C para generar colonias individuales. Se incubaron las placas durante una noche a 30 °C.

Día 3. Las colonias representan aquí eventos de desintegración y curación de plásmido simultáneos potenciales. Si los eventos de desintegración y curación sucedían tempranamente en el crecimiento, entonces el grueso de la masa de colonias será clonal. Se eligieron colonias individuales y se sembraron por duplicado en agar 2xPY que contenía cloranfenicol 20 µg/ml o sacarosa al 5 % (p/v). Se incubaron las placas durante una noche a 30 °C.

Día 4. Las colonias que tanto crecen en sacarosa como mueren en cloranfenicol representan eventos de reemplazo cromosómico y de curación de plásmido potenciales. Se eligieron estas y se cribaron por PCR con un oligonucleótido específico de mutación. Las colonias que generaron una banda de PCR positiva del tamaño correcto se recortaron para producir colonias individuales en agar 2xPY que contenía sacarosa al 5 % (p/v) y se incubaron las placas durante una noche a 30 °C.

Día 5. Se usaron colonias individuales de *E. coli* positivas de PCR, sensibles a cloranfenicol y resistentes a sacarosa para elaborar células químicamente competentes en soluciones madre de glicerol, y actúan como moldes de PCR para una reacción PCR con oligos flanqueantes 5' y 3' para generar un producto de PCR para secuenciación de ADN directa usando polimerasa Taq.

Se ensayaron las cepas celulares MXE001, MXE004 y MXE005 para confirmar la modificación exitosa de ADN genómico portador de uno o más genes de proteasa mutados por amplificación por PCR de la región de cada gen de proteasa mutada que comprende un sitio de restricción Ase I de origen no natural, como se muestra en las Figuras 1a, 1b y 1c, usando cebadores oligonucleotídicos. Se analizaron entonces las regiones amplificadas del ADN por electroforesis en gel antes y después de incubación con enzima de restricción Ase I para confirmar la presencia del sitio de restricción Ase I de origen no natural en los genes mutados. Se llevó a cabo el método como sigue:

Se usaron los siguientes oligos para amplificar, usando PCR, ADN genómico de lisados de células de *E. coli* preparadas a partir de MXE001, MXE004, MXE005 y W3110:

6284 Tsp 3'	5'-GCATCATAATTTTCTTTTACCTC-3' (SEQ ID NO: 15)
6283 Tsp 5'	5'-GGGAAATGAACCTGAGCAAAACGC-3' (SEQ ID NO: 16)
6362 Protease III 3'	5'-GTGCCAGGAGATGCAGCAGCTTGC-3' (SEQ ID NO 17)
6361 Protease III 5'	5'-TTTGCAGCCAGTCAGAAAGTG-3' (SEQ ID NO: 18)
6282 DegP 5'	5'-CTGCCTGCGATTTTCGCCGGAACG-3' (SEQ ID NO 19)
6281 DegP 3'	5'-CGCATGGTACGTGCCACGATATCC-3' (SEQ ID NO 20)

Se prepararon los lisados calentando una colonia individual de células durante 10 minutos a 95 °C en 20 µl de tampón 1x PCR. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y entonces centrifugación a 13.200 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se marcó como "lisado celular".

Se amplificó cada cepa usando cada par de oligos par de Tsp, par de proteasa III y par de DegP.

Se amplificó el ADN usando un procedimiento de PCR estándar.

- 5 ul tampón x10 (Roche)
- 1 ul mezcla de dNTP (Roche, mezcla 10 mM)
- 1,5 ul oligo 5' (5 pmol)
- 1,5 ul oligo 3' (5 pmol)
- 2 ul lisado celular

0,5 ul ADN polimerasa Taq (Roche 5U/ul)

38,5 ul H₂O

Ciclo de PCR

94 °C 1 minuto

5 94 °C 1 minuto)

55 °C 1 minuto) repetido durante 30 ciclos

72 °C 1 minuto)

72 °C 10 minutos

10 Una vez se completaron las reacciones, se retiraron 25 ul a un tubo de microcentrífuga nuevo para digestión con Ase I. Se añadieron a los 25 ul de reacción PCR 19 ul de H₂O, 5 ul de tampón 3 (NEB), 1 ul de Ase I (NEB), se mezcló y se incubó a 37 °C durante 2 horas.

15 Se añadieron a la reacción PCR restante 5 ul de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 ul en 200 ml de gel de agarosa con TAE al 0,8 % (Invitrogen) más bromuro de etidio (5 ul de solución madre de 10 mg/ml) y se ejecutó a 110 voltios durante 1 hora. Se cargaron 10 ul de marcador de tamaño (marcador de ADN Perfect de 0,1-12 Kb, Novagen) en el carril final.

Una vez se completaron las digestiones con Ase I, se añadieron 10 ul de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 ul en gel de agarosa con TAE al 0,8 % (Invitrogen) más bromuro de etidio (5 ul de solución madre 10 mg/ml) y se ejecutó a 100 voltios durante 1 hora. Se cargaron 10 ul de marcador de tamaño (marcador de ADN Perfect de 0,1-12 Kb, Novagen) en el carril final.

20 Se visualizaron ambos geles usando un transiluminador de UV.

Todos los fragmentos genómicos amplificados mostraron la banda de tamaño correcto de 2,8 kb para Tsp, 1,8 kb para proteasa III y 2,2 kb para DegP.

Después de digestión con Ase I, esto confirmó la presencia de sitios Ase I introducidos en las cepas deficientes de proteasa pero no en el control de W3110.

25 MXE001: Se amplificó ADN genómico usando el conjunto de cebadores de Tsp y se digirió el ADN resultante con Ase I, produciendo bandas de 2,2 y 0,6 kpb.

MXE004: Se amplificó ADN genómico usando el conjunto de cebadores de Tsp y el conjunto de cebadores de proteasa III y se digirió el ADN resultante con Ase I, produciendo bandas de 2,2 y 0,6 kpb (fragmentos de Tsp) y bandas de 1,0 y 0,8 kpb (fragmentos de proteasa III).

30 MXE005: Se amplificó ADN genómico usando el conjunto de cebadores de Tsp y el conjunto de cebadores de DegP y se digirió el ADN resultante con Ase I, produciendo bandas de 2,2 y 0,6 kpb (fragmentos de Tsp) y bandas de 1,25 y 0,95 kpb (fragmentos de DegP).

El ADN amplificado por PCR de W3110 no se digirió con la enzima de restricción Ase I.

35 Se construyó el plásmido pMXE117 (pTTO CDP870 o 40.4), un vector de expresión de Fab' CDP870 (un Fab' anti-TNF), usando metodologías de clonación de restricción convencionales que pueden encontrarse en Sambrook et al 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual". CSHL press, N.Y. El plásmido pMXE1 17 (pTTO CDP870 o 40.4) contenía los siguientes rasgos: un promotor *tac* fuerte y una secuencia operadora *lac*. Se transcribieron los genes de cadena ligera y pesada de Fab en forma de un mensaje dicistrónico individual. Se fusionó el ADN codificante del péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* con el extremo 5' de ambas secuencias génicas de cadena ligera y pesada, que dirigían la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. Se terminó la transcripción usando un terminador de transcripción dual *rrnB* *tlt2*. El gen *lacIq* codificaba la proteína represora Lac I expresada constitutivamente. Esta transcripción reprimida del promotor *tac* hasta desrepresión se indujo por la presencia de alolactosa o IPTG. El origen de replicación usado era p15A, que mantenía un bajo número de copias. El plásmido contenía un gen de resistencia a tetraciclina para selección de antibiótico.

45 Se transformó entonces pMXE117 en células deficientes en proteasas químicamente competentes (cepas MXE001, MXE004 y MXE005) y células W3110 preparadas usando el método encontrado en Chung C.T et al. "Transformation and storage of bacterial cells in the same solution". PNAS 86: 2172-2175 (1989).

Ejemplo 2- Expresión de un Fab anti-TNF α en cepas de *E. coli* mutadas usando cultivos de matraz agitado

Se ensayaron las cepas MXE001, MXE004 y MXE005 en un experimento de matraz agitado que compara el

crecimiento y la expresión de un Fab' anti-TNF α contra W3110.

Se efectuó el protocolo experimental de matraz agitado usado como sigue:

Preparación de células adaptadas a medio definido.

- 5 Se eligió una colonia individual en 5 ml de caldo 2xPY (1 % de Phytone, Difco, 0,5 % de extracto de levadura, Difco, 0,5 % de NaCl) más tetraciclina (Sigma) a 10 ug/ml y se dejó crecer durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se usaron 100 ul de este cultivo de una noche para inocular 200 ml de medio SM6E químicamente definido (descrito en Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320) más tetraciclina 10 ug/ml, crecido durante una noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. Se usaron 100 ul de este segundo cultivo de una noche para inocular un segundo matraz de medio SM6E de 200 ml más tetraciclina 10 ug/ml. Se dejó crecer este hasta que el cultivo alcanzó una DO600 de aproximadamente 2. Se centrifugaron los cultivos brevemente para recoger células antes de resuspender en 100 ml de SM6E. Se añadió glicerol a una concentración final del 12,5 % antes de almacenar alícuotas de "células adaptadas" a -80 °C.

Experimento de matraz de cultivo de 200 ml

- 15 Se iniciaron cultivos de matraz agitado mediante la adición de una alícuota de 2 ml de medio definido descongelado de "células adaptadas" a 200 ml de medio SM6E más tetraciclina 10 ug/ml. Se dejaron crecer estos durante una noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. Cada cepa que se ensaya se dejó crecer por triplicado.

- 20 Se indujo en cultivos crecidos hasta DO600 de 2,0 la producción de proteína heteróloga mediante la adición de IPTG 200 uM. Se tomaron muestras de cultivo de 1 ml a 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h y, después de centrifugación a 13.200 rpm durante 5 minutos, se resuspendió el sedimento celular en 200 ul de tampón de extracción periplásmica (Tris·Cl 100 mM/EDTA 10 mM pH 7,4). Se agitaron los extractos periplásmicos a 250 rpm durante una noche a 30 °C. El día siguiente, se centrifugaron los extractos durante 10 minutos a 13.200 rpm, se decantó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C como "extracto periplásmico". Se desechó el sedimento de células gastadas.

Cuantificación de ELISA

- 25 Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con AB141 (CH1 de conejo anti-humano, UCB) a 2 μgml^{-1} en PBS. Después de lavar 3x con 300 ul de tampón de muestra/conjugado (PBS, BSA al 0,2 % (p/v), Tween 20 al 0,1 % (v/v)), se efectuaron diluciones en serie 1/2 de muestras y patrones en la placa en 100 μl de tampón de muestra/conjugado y se agitó la placa a 250 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3x con 300 ul de tampón de lavado (PBS, 0,1 % de Tween 20 (v/v)), se añadieron 100 μl del anticuerpo de revelado 6062 (kappa de conejo anti-humano, conjugado con HRP, The Binding Site, Birmingham, RU) después de dilución a 1/1000 en tampón de muestra/conjugado. Se agitó entonces la placa a 250 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con 3x 300 ul de tampón de lavado, se añadieron 100 μl de sustrato TMB (mezcla 50:50 de solución de TMB (Calbiochem):H₂O₂) y se registró la A₆₃₀ usando un lector de placas automatizado. Se calculó la concentración de Fab' en los extractos periplásmicos por comparación con patrones de Fab' purificados del isotipo apropiado.

- 35 La Figura 2 muestra el crecimiento de MXE005 y MXE001 en comparación con W3110 de tipo silvestre. La Figura 3 muestra la expresión mejorada de Fab' de las cepas MXE005 y MXE001 en comparación con W3110 de tipo silvestre.

La Figura 4 muestra el crecimiento de MXE004 y W3110 y la Figura 5 muestra la expresión de Fab' en MXE004 y W3110, donde puede verse que la expresión de MXE004 era mayor que de W3110.

- 40 Ejemplo 3 – Expresión de un Fab de ratón anti-mIL13 en cepas de *E. coli* mutadas usando cultivos de matraz agitado

Se transformaron las cepas MXE001, MXE004, MXE005 y células W3110 de tipo silvestre con el plásmido pMKC006 que expresa un Fab' anti-mIL13 murinizado y se ensayaron usando el mismo método de matraz agitado descrito en el Ejemplo 2, excepto que el experimento se detuvo después de 6 horas en lugar de 24 horas.

- 45 La Figura 6 muestra la expresión de un Fab de ratón anti-mIL-13 en MXE001, MXE004, MXE005 y W3110, donde puede verse que MXE001, MXE004 y MXE005 muestran mayor expresión de Fab en comparación con W3110.

Ejemplo 4- Análisis de la expresión de cadena ligera y pesada a partir de cepas de *E. coli* mutadas

- 50 Se transformaron extractos periplásmicos de la cepa MXE005 y células W3110 de tipo silvestre con el plásmido pMXE117, del experimento de matraz agitado descrito en el Ejemplo 2, y se ensayaron usando un ensayo de unión de resonancia de plasmón de superficie efectuado usando un instrumento BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizó el Fab' anti-TNF sobre chips sensores CM5 usando química de NHS/EDC estándar. Se inactivaron los ésteres de NHS residuales con hidrocloreto de etanolamina (1 M).

Se capturaron los fragmentos Fab' por un anticuerpo monoclonal inmovilizado anti-cadena pesada o monoclonal

inmovilizado anti-cadena ligera en celdas de flujo separadas. Se reveló la presencia del Fab' unido por unión del anticuerpo monoclonal complementario (anti-cadena ligera o anti-cadena pesada) en una segunda etapa. Los altos niveles de anticuerpo inmovilizado aseguran que las medidas se efectúan en condiciones de transporte de masa limitado, en que la contribución de la constante de la velocidad de asociación a la unión es baja en comparación con la contribución realizada por la concentración de Fab' en la muestra. El anticuerpo monoclonal en fase de disolución usado en la segunda etapa se pasa sobre la superficie a una alta concentración, de modo que la unión no está limitada por la constante de velocidad de asociación de esta interacción.

Los fragmentos de Fab' ensamblados y cadenas no ensambladas correctamente plegadas se detectan ambos durante la primera etapa de captura. La unión del segundo anticuerpo es solo con un fragmento de Fab' intacto. Por lo tanto, el análisis de la unión relativa en el primer y segundo pasos revela la presencia de cadena ligera no ensamblada en exceso o bien cadena pesada no ensamblada en exceso en la muestra de Fab' y proporciona información sobre la estequiometría del ensamblaje.

Se efectuaron los ensayos en ambas configuraciones para cada muestra, y se ejecutó cada muestra por duplicado y en orden aleatorio.

(i) Cuando tenía que determinarse la concentración de Fab' ensamblado por captura de cadena ligera, se inyectaron muestras y patrones (a 10 gl/min) sobre HP6053 inmovilizado, seguido de una segunda etapa en que se pasaba HP6045 a 300 Rg/ml sobre la superficie en fase de disolución.

(ii) Cuando tenía que determinarse la concentración de Fab' ensamblado por captura de cadena pesada, se inyectaron muestras y patrones (10t a tOjuVmin) sobre HP6045 inmovilizado, seguido de una segunda etapa en que se pasaba HP6053 a 5001ug/ml sobre la superficie en fase de disolución. En ambos casos, se regeneró la superficie con 10 gi of 30mM de HCl 30 mM a 30 l/min.

Se leyó el número de unidades de resonancia determinado usando BIAevaluation 3.1 (Pharmacia Biosensor AB) frente a una curva patrón.

La Figura 7 muestra la expresión de cadena ligera (cadena L), cadena pesada (cadena H) y Fab durante el transcurso de una tanda de fermentación, donde se muestra una mayor expresión de cadena ligera, cadena pesada y Fab' a partir de MXE001 después de 2 horas, 4 horas y 6 horas en comparación con W3110. La Figura 7 muestra una mayor expresión de cadena ligera después de 6 horas a partir de MXE005 en comparación con W3110 y una mayor expresión de Fab' a partir de MXE005 después de 2 horas, 4 horas y 6 horas en comparación con W3100.

Ejemplo 5 – Análisis de la actividad de proteólisis de cepas de *E. coli* mutadas para Fab'

Se ensayaron extractos periplásmicos de las cepas MXE001, MXE005 y células W3110 de tipo silvestre transformadas con plásmido pMXE117 del experimento de matraz agitado del ejemplo 2 en un análisis de transferencia Western que compara la proteólisis de un Fab' anti-TNF α como sigue:

Se calentaron a 85 °C durante 5 minutos 12 ul de cada extracto periplásmico más 4 ul de tampón de carga de PAGE-SDS (Invitrogen), se dejaron enfriar a 25 °C y se centrifugaron entonces brevemente antes de cargar en un gel Bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE (Invitrogen) preparado anteriormente. Se usaron marcadores de tamaño SeeBlue 2 (Invitrogen) para la estimación del peso molecular. Se sometió a electroforesis el gel durante 1 hora a 150 V antes de transferencia de proteínas sobre membrana de PVDF prehumedecida (Invitrogen) usando inmunotransferencia a 150 mA durante 2 horas. Se bloqueó la membrana durante 1 h en "tampón de bloqueo" (PBS, 3 % (p/v) de leche en polvo, 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Sigma)) con agitación suave. Se aplicó un Fab' policlonal de conejo anti-humano (UCB) a una dilución de 1 a 1000 en 5 ml de tampón de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Se lavó la membrana tres veces durante 5 min cada vez con agitación suave con tampón de bloqueo. Se aplicó un anticuerpo secundario (IgG de burro anti-conejo conjugado con HRP (Jackson)) a una dilución de 1 a 5000 en tampón de bloqueo con incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos cada vez con agitación en primer lugar con tampón de bloqueo seguido de PBS, 0,1 % de Tween, durante dos lavados y entonces PBS para el lavado final. Se visualizó la transferencia usando sustrato Metal Enhanced Dab (Thermo Scientific).

La Figura 8 muestra los resultados del análisis de transferencia Western en que W= W3110, 1= MXE001 (Δ Tsp) y 5= MXE005 (Δ Tsp, DegP S210A). Se cree que la fragmentación alrededor de 14 kDa representa fragmentos proteolíticos de la cadena ligera del Fab' expresado. Puede verse que MXE001 y MXE005 tienen menos productos proteolizados en comparación con W3110 de tipo silvestre alrededor de la marca de 14 kDa. Sin limitarse por la teoría, este dato sugiere que el Fab' anti-TNF α es susceptible de proteólisis por Tsp y DegP.

Ejemplo 6- Crecimiento de cepas de *E. coli* mutadas y expresión de Fab' en cepas de *E. coli* mutadas usando fermentaciones de alta densidad.

La cepa MXE005 y las células W3110 de tipo silvestre transformadas con plásmido pMXE117 se ensayaron en experimentos de fermentación que comparan crecimiento y expresión de un Fab' anti-TNF α .

Medio de crecimiento.

El medio de crecimiento de fermentación estaba basado en medio SM6E (descrito en Humphreys et al., 2002, "Protein Expression and Purification", 26, 309-320) con 3,86 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y glicerol 112 g/l.

Inóculo. Se dejaron crecer los cultivos de inóculo en el mismo medio suplementado con tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubaron los cultivos a 30 °C con agitación durante aproximadamente 22 horas.

Fermentación. Se sembraron fermentadores (2,5 litros de volumen final) con cultivo de inóculo a DO_{600} de 0,3-0,5. Se mantuvo la temperatura a 30 °C durante la fase de crecimiento y se redujo a 25 °C antes de la inducción. Se mantuvo la concentración de oxígeno disuelto por encima de 30 % de saturación del aire por agitación variable y flujo de aire. Se controló el pH de cultivo a 7,0 por titulación automática con NH_4OH al 15 % (v/v) y H_2SO_4 con. al 10 % (v/v). Se controló la espumación mediante la adición de una solución Struktol J673 al 10 % (v/v) (Schill y Seilacher).

Se realizaron una serie de adiciones en diferentes pasos de la fermentación. Cuando la concentración de biomasa alcanzó aproximadamente una DO_{600} de 40, se añadieron sales de magnesio y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Se realizaron adiciones adicionales de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ antes y durante la fase de inducción para asegurar que el fosfato se mantenía en exceso. Cuando el glicerol presente al inicio de la fermentación se agotó (DO_{600} de aproximadamente 75), se aplicó una alimentación continua de glicerol al 80 % (p/p). En el mismo punto de la fermentación, se aplicó una alimentación de IPTG 170 μM . Se tomó el inicio de la alimentación de IPTG como el inicio de la inducción. Se ejecutaron las fermentaciones típicamente durante 70-73 horas a las tasas de alimentación de glicerol menores (0,5-2,5 ml/h) y 50-60 h a las tasas de alimentación de glicerol mayores (5,4-10,9 ml/h).

Medida de la concentración de biomasa y tasa de crecimiento. Se determinó la concentración de biomasa midiendo la densidad óptica de cultivos a 600 nm.

Extracción periplásmica. Se recogieron células de muestras de cultivo por centrifugación. Se retuvo la fracción sobrenadante (a -20 °C) para análisis adicional. Se resuspendió la fracción de sedimento celular al volumen de cultivo original en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM; pH 7,4). Después de incubación a 60 °C durante aproximadamente 16 horas, se clarificó el extracto por centrifugación y se retuvo la fracción sobrenadante (a -20 °C) para análisis.

Cuantificación de Fab'. Se determinaron las concentraciones de Fab' en extractos periplásmicos y sobrenadantes de cultivo por ELISA de ensamblaje de Fab' como se describe en Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320.

La Figura 9 muestra el perfil de crecimiento de MXE001 en comparación con W3110 de control, que muestra que los perfiles de control son sustancialmente los mismos durante aproximadamente 35 horas.

La Figura 10 muestra el rendimiento de Fab de sobrenadante (líneas de puntos) y periplasma (líneas continuas) de la cepa de *E. coli* MXE001 en comparación con W3110 de control. La cepa MXE001 muestra mayor expresión de Fab' periplásmica hasta aproximadamente 30 horas y una expresión de Fab' en sobrenadante significativamente superior durante todo el periodo de fermentación.

La Figura 11 muestra el rendimiento de Fab' total de sobrenadante y periplasma de la cepa de *E. coli* MXE001 en comparación con W3110 de control, donde puede verse que la cepa MXE005 producía mayor rendimiento de Fab' en comparación con W3110 de control.

La Figura 12 muestra la tasa de producción específica de Fab' de la cepa de *E. coli* MXE001 en comparación con W3110 de control, donde puede verse que MXE001 tiene una tasa de producción específica significativamente mayor en comparación con W3110.

La Figura 13 muestra el perfil de crecimiento de MXE004 y MXE005 en comparación con W3110 de control. Los perfiles de crecimiento de MXE004 y MXE005 son más rápidos durante el periodo inicial de aproximadamente 35 horas en comparación con W3110 de control.

La Figura 14 muestra los rendimientos de Fab' de sobrenadante (líneas de puntos) y periplasma (líneas continuas) de las cepas de *E. coli* MXE004, MXE005 y control W3110. La cepa MXE005 muestra mayor rendimiento de Fab' de periplasma durante aproximadamente 28 horas en comparación con el control y un rendimiento de Fab' de sobrenadante significativamente mayor en comparación con el control durante todo el periodo de fermentación. La cepa MXE004 muestra mayor rendimiento de Fab' de periplasma durante aproximadamente 20 horas en comparación con el control y un rendimiento de Fab' de sobrenadante significativamente mayor en comparación con el control durante todo el periodo de fermentación.

La Figura 15 muestra el rendimiento de Fab' de sobrenadante y periplasma de las cepas de *E. coli* MXE004 y MXE005, donde puede verse claramente que las cepas MXE004 y MXE005 producían un rendimiento significativamente mayor en comparación con el control.

La Figura 16 muestra la tasa de producción específica de las cepas de *E. coli* MXE004 y MXE005 y el control W3110, donde puede verse que MXE004 y MXE005 tienen una tasa de producción específica significativamente mayor en comparación con W3110.

Ejemplo 7- Crecimiento de las cepas de *E. coli* mutadas MXE001, MXE004 y MXE005 en comparación con W3110 y cepas de *E. coli* altamente mutadas en experimentos de matraz agitado

Se analizaron las siguientes cepas en un experimento de matraz agitado para valorar la tasa de crecimiento::

Cepas de *E. coli* mutadas MXE001, MXE004 y MXE005 derivadas de W3110 (Ejemplo 1)

Cepa de *E. coli* de tipo silvestre W3110

SURE (Stratagene) que tiene el genotipo: endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10]

STBL3 (Invitrogen) que tiene el genotipo: F- glnV44 recA13 mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 leu mtl-1

TOP10 (Invitrogen) que tiene el genotipo: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

y

XL1-Blue (Stratagene) que tiene el genotipo endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)

Se eligió una única colonia en 5 ml de caldo LB (10 g de Tryptone, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro) y se dejó crecer durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se usó el cultivo de una noche para inocular 75 ml de caldo LB a una DO₆₀₀ de 0,1 (n= 2). Se dejaron crecer los cultivos a 37 °C con agitación a 250 rpm, se retiraron muestras de 0,2 ml cada hora y se registró la DO₆₀₀. Se representó entonces la DO₆₀₀ frente al tiempo en horas y se muestran los resultados en la Figura 17. Puede verse por la Figura 17 que las cepas de *E. coli* fuertemente mutadas tienen una menor tasa de crecimiento en comparación con MXE001, MXE004, MXE005 y W3110.

Listado de secuencias

<110> UCB PHARMA S.A.

<120> CEPA HOSPEDADORA BACTERIANA

<130> G0091

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2049

<212> ADN

<213> *E. coli*

<400> 1

ES 2 692 811 T3

atgaacatgt ttttttaggct taccgcgtta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc	60
ttcgctgtag aagatatcac gcgtgctgat caaattccgg tattaagga agagacgcag	120
catgcgacgg taagtgagcg cgtaacgtcg cgcttcaccc gttctcatta tcgccagttc	180
gacctcgatc aggcattttc ggccaaaatc tttgaccgct acctgaatct gctcgattac	240
agccacaacg tgctgctggc aagcgatggt gaacagttcg cgaaaaagaa aaccgagtta	300
ggcgatgaac tgcgttcagg caaactcgac gttttctacg atctctacaa tctggcgcaa	360
aagcgccggt ttgagcggtta ccagtagcgt ttgtcggtac tggaaaagcc gatggatttc	420
accggcaacg acacttataa ccttgaccgc agcaaagcgc cctggccgaa aaacgaggct	480
gagttgaacg cgctgtggga cagtaaagtc aaattcgacg agttaagcct gaagctgaca	540
ggaaaaacgg ataaagaaat tcgtgaaacc ctgactcgcc gctacaaatt tgccattcgt	600
cgtctggcgc aaaccaacag cgaagatggt ttctcgctgg caatgacggc gtttgcgctg	660
gaaatcgacc cgcataccaa ctatctttcc ccgcgtaata ccgaacagtt caacactgaa	720
atgagtttgt cgctggaagg tattggcgca gtgtgcgaaa tggatgatga ctacaccgtt	780
atcaattcga tggtagcagc tggtagcagc gcgaagagta aagctatcag cgttggtgac	840
aaaattgtcg gtgttggtca aacaggcaag ccgatgggtg acgtgattgg ctggcgtctt	900
gatgatgtgg ttgccttaat taaagggcgc aagggcagta aagttcgtct ggaaatttta	960
cctgctggta aagggaccaa gaccgtact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc	1020
gaagaccgcg cggttaaaat gtcggtgaag accgtcggtg aagagaaagt cggcgtgctg	1080
gatattccgg gcttctatgt gggtttgaca gacgatgtca aagtgcact gcagaaactg	1140
gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcatc gacctgcgta gcaatggcgg tggggcggtta	1200
actgaagccg tatcgctctc cggctctgtt attcctgcgg gtccattgt tcaggtccgc	1260
gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gataccgacg gacaggtttt ctataaaggc	1320
ccgctggtgg tgctggttga ccgcttcagt gcttcggctt cagaaatctt tgccgcggca	1380
atgcaggatt acggtcgtgc gctggttggt ggtgaaccga cgtttggtta aggcaccgtt	1440
cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggccagcg	1500
ctgggttctg tgcagtagac gatccagaaa ttctatcgcg ttaacggcgg cagtacgcaa	1560
cgtaaaggcg taacgccaga catcatcatg ccgacgggta atgaagaaac ggaaacgggt	1620
gagaaattcg aagataacgc gctgccgtgg gatagcattg atgccgcgac ttatgtgaaa	1680
tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgtgaagg aacataatgc gcgtatcgcg	1740
aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatcgcg gcttcaacgc tatgaaggac	1800
aagcgcaata tcgtttctct gaattacgct gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat	1860
gcgacgcgtc tggcgcggtt gaacgaacgc tttaaacgcg aaggtaaacc ggagttgaag	1920
aaactggatg atctaccgaa agattaccag gagccggatc cttatctgga tgagacgggtg	1980
aatatcgcac tcgatctggc gaagcttgaa aaagccagac ccgcggaaca acccgctccc	2040
gtcaagtaa	2049

ES 2 692 811 T3

<211> 682
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 2

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

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

5

ES 2 692 811 T3

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
 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

ES 2 692 811 T3

370																			
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				
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									

ES 2 692 811 T3

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> 3

<211> 2048

<212> ADN

5 <213> E. coli

<400> 3

atgaattcgt	ttttaggctt	accgcgttag	ctggcctgct	tgcaatagca	ggccagacat	60
taattgtaga	agatatcacg	cgtgctgac	aaattccggt	attaaaggaa	gagacgcagc	120
atgcgacggt	aagtgagcgc	gtaacgtcgc	gcttcacccg	ttctcattat	cgccagttcg	180
acctcgatca	ggcattttcg	gccaaaatct	ttgaccgcta	cctgaatctg	ctcgattaca	240
gccacaacgt	gctgctggca	agcgatgttg	aacagttcgc	gaaaaagaaa	accgagttag	300
gcgatgaact	gcgttcaggc	aaactcgacg	ttttctacga	tctctacaat	ctggcgcaaa	360
agcgccggtt	tgagcggttac	cagtacgctt	tgctcggtact	ggaaaagccg	atggatttca	420
ccggcaacga	cacttataac	cttgaccgca	gcaaagcgcc	ctggccgaaa	aacgaggctg	480
agttgaacgc	gctgtgggac	agtaaagtca	aattcgacga	gttaagcctg	aagctgacag	540
gaaaaacgga	taaagaaatt	cgtgaaaccc	tgactcgccg	ctacaaattt	gccattcgctc	600
gtctggcgca	aaccaacagc	gaagatgttt	tctcgctggc	aatgacggcg	tttgcgcggtg	660
aaatcgaccc	gcataccaac	tatctttccc	cgcgtaatac	cgaacagttc	aacactgaaa	720
tgagtttgct	gctggaaggt	attggcgagc	tgctgcaaata	ggatgatgac	tacaccgtta	780
tcaattcgat	ggtggcaggt	ggtccggcag	cgaagagtaa	agctatcagc	gttggtgaca	840
aaattgtcgg	tggttggtcaa	acaggcaagc	cgatggttga	cgtgattggc	tggcgtcttg	900
atgatgtggt	tgctttaatt	aaagggccga	agggcagtaa	agttcgtctg	gaaattttac	960
ctgctggtaa	agggaccaag	accgctactg	taacgttgac	ccgtgaacgt	attcgtctcg	1020
aagaccgcgc	ggttaaaatg	tcggtgaaga	ccgtcggtaa	agagaaagtc	ggcgtgctgg	1080
atattccggg	cttctatgtg	ggtttgacag	acgatgtcaa	agtgcaactg	cagaaactgg	1140
aaaaacagaa	tgtcagcagc	gtcatcatcg	acctgcgtag	caatggcggt	ggggcggttaa	1200
ctgaagccgt	atcgctctcc	ggtctgttta	ttcctgcggg	tcccattgtt	caggtccgcg	1260

ES 2 692 811 T3

ataacaacgg caaggttcgt gaagatagcg ataccgacgg acaggttttc tataaaggcc	1320
cgctggtggt gctggttgac cgcttcagtg cttcggttc agaatcttt gccgcggcaa	1380
tgcaggatta cggtcgtgcg ctggttggtg gtgaaccgac gtttggtaaa ggcaccgttc	1440
agcaataaccg ttcatgtaac cgtatttacg atcagatggt acgtcctgaa tggccagcgc	1500
tgggttctgt gcagtacacg atccagaaat tctatcgctg taacggcggc agtacgcaac	1560
gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg	1620
agaaattcga agataacgcg ctgccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat	1680
caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcgca	1740
aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcg cttcaacgct atgaaggaca	1800
agcgcaatat cgtttctctg aattacgctg tgcgtgagaa agagaataat gaagatgatg	1860
cgacgcgtct gccgcgtttg aacgaacgct ttaaaccgca aggtaaaccg gagttgaaga	1920
aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacggtga	1980
atatcgcaact cgatctggcg aagcttgaaa aagccagacc cgcggaacaa cccgctccc	2040
tcaagtaa	2048

<210> 4

<211> 2889

<212> ADN

5 <213> E. coli

<400> 4

atgccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgcccttg ggcaccctta	60
agtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat	120
aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat	180
ccgcaggcag ttaaatcgct ctcggcgctg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc	240
gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag	300
taccgcgagg ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc	360
agcactgcgc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgacgc cttgcctggt	420
gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa	480
cgtgagcgta atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc	540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt	600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat	660
ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaaccg	720
ctgccggagt tggcaaaaat ggcggcggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc	780
aaaaaaccgg aaatcacctg gccggtagtc accgacgcgc aaaaggcat tatcattcat	840

ES 2 692 811 T3

tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcgttgagt ttcgcatcga taacaactca	900
gcgaagttcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtagacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc	1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa	1080
ggcctggcta atcgcgatca ggttgtggcg gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt	1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc	1200
cgttatccgt cgatcacccg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt	1260
cgcgttctctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa	1320
gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc	1380
ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgcgtatca ggtcgataaa	1440
atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaagccg ccgacattgc gctctctttg	1500
ccagagctta acccttatat tctgatgat ttctcgctga ttaagtcaga gaagaaatac	1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagccgt	1620
tattttgcca gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg	1680
gacagcgcgc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgctt	1740
gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggg ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac	1800
ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctgtt ccaggcattg	1860
ctcagaggggt acttttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg	1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc	1980
gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc	2040
tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggctcgacca	2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg	2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgcgaa acaaagatgt agtggtcgat	2220
aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg	2280
gtatttgtac cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgggg	2340
cagatcgtac agccgtggtt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt gggctatgcc	2400
gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc	2460
aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag	2520
gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggtaattacc	2580
cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taaagatttc	2640
gatcgcggca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg	2700
acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg tcgagccgca aggcattggct	2760
attctgtcgc agatttccgg cagccagaac gggaaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc	2820
tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaaacaa tgcccctgat gagtgaaaag	2880
aatgagtga	2889

<210> 5

5 <211> 962

ES 2 692 811 T3

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 5

```

Met  Pro  Arg  Ser  Thr  Trp  Phe  Lys  Ala  Leu  Leu  Leu  Leu  Val  Ala  Leu
1              5              10              15

Trp  Ala  Pro  Leu  Ser  Gln  Ala  Glu  Thr  Gly  Trp  Gln  Pro  Ile  Gln  Glu
              20              25              30

Thr  Ile  Arg  Lys  Ser  Asp  Lys  Asp  Asn  Arg  Gln  Tyr  Gln  Ala  Ile  Arg
              35              40              45

Leu  Asp  Asn  Gly  Met  Val  Val  Leu  Leu  Val  Ser  Asp  Pro  Gln  Ala  Val
50              55              60

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

Glu  Ala  Tyr  Gln  Gly  Leu  Ala  His  Tyr  Leu  Glu  His  Met  Ser  Leu  Met
              85              90              95

Gly  Ser  Lys  Lys  Tyr  Pro  Gln  Ala  Asp  Ser  Leu  Ala  Glu  Tyr  Leu  Lys
              100              105              110

Met  His  Gly  Gly  Ser  His  Asn  Ala  Ser  Thr  Ala  Pro  Tyr  Arg  Thr  Ala
              115              120              125

Phe  Tyr  Leu  Glu  Val  Glu  Asn  Asp  Ala  Leu  Pro  Gly  Ala  Val  Asp  Arg
              130              135              140

Leu  Ala  Asp  Ala  Ile  Ala  Glu  Pro  Leu  Leu  Asp  Lys  Lys  Tyr  Ala  Glu
145              150              155              160

Arg  Glu  Arg  Asn  Ala  Val  Asn  Ala  Glu  Leu  Thr  Met  Ala  Arg  Thr  Arg
              165              170              175

Asp  Gly  Met  Arg  Met  Ala  Gln  Val  Ser  Ala  Glu  Thr  Ile  Asn  Pro  Ala
              180              185              190

```

ES 2 692 811 T3

His Pro Gly Ser Lys Phe Ser Gly Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ser Asp
 195 200 205
 Lys Pro Gly Asn Pro Val Gln Gln Ala Leu Lys Asp Phe His Glu Lys
 210 215 220
 Tyr Tyr Ser Ala Asn Leu Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Asn Lys Pro
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Leu Ala Lys Met Ala Ala Asp Thr Phe Gly Arg Val Pro
 245 250 255
 Asn Lys Glu Ser Lys Lys Pro Glu Ile Thr Val Pro Val Val Thr Asp
 260 265 270
 Ala Gln Lys Gly Ile Ile Ile His Tyr Val Pro Ala Leu Pro Arg Lys
 275 280 285
 Val Leu Arg Val Glu Phe Arg Ile Asp Asn Asn Ser Ala Lys Phe Arg
 290 295 300
 Ser Lys Thr Asp Glu Leu Ile Thr Tyr Leu Ile Gly Asn Arg Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Thr Leu Ser Asp Trp Leu Gln Lys Gln Gly Leu Val Glu Gly Ile
 325 330 335
 Ser Ala Asn Ser Asp Pro Ile Val Asn Gly Asn Ser Gly Val Leu Ala
 340 345 350
 Ile Ser Ala Ser Leu Thr Asp Lys Gly Leu Ala Asn Arg Asp Gln Val
 355 360 365
 Val Ala Ala Ile Phe Ser Tyr Leu Asn Leu Leu Arg Glu Lys Gly Ile
 370 375 380
 Asp Lys Gln Tyr Phe Asp Glu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Phe
 385 390 395 400
 Arg Tyr Pro Ser Ile Thr Arg Asp Met Asp Tyr Val Glu Trp Leu Ala
 405 410 415
 Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn
 420 425 430
 Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met
 435 440 445

ES 2 692 811 T3

Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro
450 455 460

His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys
465 470 475 480

Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile
485 490 495

Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser
500 505 510

Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp
515 520 525

Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser
530 535 540

Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met
545 550 555 560

Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala
565 570 575

Gly Leu Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Gln Ala Ser Val Gly Gly Ile
580 585 590

Ser Phe Ser Thr Asn Ala Asn Asn Gly Leu Met Val Asn Ala Asn Gly
595 600 605

Tyr Thr Gln Arg Leu Pro Gln Leu Phe Gln Ala Leu Leu Glu Gly Tyr
610 615 620

Phe Ser Tyr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Glu Gln Ala Lys Ser Trp
625 630 635 640

Tyr Asn Gln Met Met Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Ala Phe Glu Gln
645 650 655

Ala Ile Met Pro Ala Gln Met Leu Ser Gln Val Pro Tyr Phe Ser Arg
660 665 670

Asp Glu Arg Arg Lys Ile Leu Pro Ser Ile Thr Leu Lys Glu Val Leu
675 680 685

Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Ser Gly Ala Arg Pro Glu Phe Met Val

ES 2 692 811 T3

690		695		700
Ile Gly Asn Met Thr Glu Ala Gln Ala Thr Thr Leu Ala Arg Asp Val				
705		710		715 720
Gln Lys Gln Leu Gly Ala Asp Gly Ser Glu Trp Cys Arg Asn Lys Asp				
		725		730 735
Val Val Val Asp Lys Lys Gln Ser Val Ile Phe Glu Lys Ala Gly Asn				
		740		745 750
Ser Thr Asp Ser Ala Leu Ala Ala Val Phe Val Pro Thr Gly Tyr Asp				
		755		760 765
Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ile Val Gln				
		770		775 780
Pro Trp Phe Tyr Asn Gln Leu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Gly Tyr Ala				
		785		790 795 800
Val Phe Ala Phe Pro Met Ser Val Gly Arg Gln Trp Gly Met Gly Phe				
		805		810 815
Leu Leu Gln Ser Asn Asp Lys Gln Pro Ser Phe Leu Trp Glu Arg Tyr				
		820		825 830
Lys Ala Phe Phe Pro Thr Ala Glu Ala Lys Leu Arg Ala Met Lys Pro				
		835		840 845
Asp Glu Phe Ala Gln Ile Gln Gln Ala Val Ile Thr Gln Met Leu Gln				
		850		855 860
Ala Pro Gln Thr Leu Gly Glu Glu Ala Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe				
		865		870 875 880
Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln				
		885		890 895
Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala				
		900		905 910
Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser				
		915		920 925
Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp				
		930		935 940
Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys				
		945		950 955 960

Asn Glu

<210> 6

5 <211> 2915

<212> ADN

<213> E. coli

ES 2 692 811 T3

<400> 6

attccccgca gcacctgggtt caaagcatta ttgttgtag ttgccctttg ggcacattaa	60
tgtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat	120
aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat	180
ccgcaggcag ttaaatcgct ctccggcgctg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc	240
gaggcgtagc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag	300
taccgcagg ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc	360
agcactgcgc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttag agaacgacgc cttgcctggt	420
gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa	480
cgtgagcgta atgcgggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc	540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt	600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tcgagcaggc gctgaaagat	660
ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacccg	720
ctgccggagt tggcaaaaat ggccggcgac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc	780
aaaaaacccg aaatcacctg gccggtagtc accgacgcgc aaaagggcatt tatcattcat	840
tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcgttgagt ttcgcatcga taacaactca	900
gcgaagtcc tagtataaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc	1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa	1080
ggcctggcta atcgcgatca ggttggtggc gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt	1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc	1200
cgttatccgt cgatcacccg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt	1260
cgcgttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa	1320
gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc	1380
ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgccgtatca ggtcgataaa	1440
atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg	1500

ES 2 692 811 T3

ccagagctta acccttatat tctgatgat ttctcgctga ttaagtcaga gaagaaatac 1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagcgt 1620
tattttgcc a gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
gacagcgccc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgctt 1740
gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggt ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac 1800
ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctgtt ccaggcattg 1860
ctcgaggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg 1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
gcgcatgatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc 2040
tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggctcgacca 2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgctga acaaagatgt agtggtcgat 2220
aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
gtatttgtag cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgagg 2340
cagatcgtag agccgtgggt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggtaattacc 2580
cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taaagatttc 2640
gatcgcgga atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg tcgagccgca aggcattggct 2760
attctgtcgc agatttccg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
tggaagtggt gggagaacgt cagcgcggtg cagcaaaca tgcccctgat gagtgaagag 2880
aatgagtgat gtcgccgaga cactagatcc tttgc 2915

<210> 7

<211> 1425

<212> ADN

5 <213> E. coli

<400> 7

atgaaaaaaa ccacattagc actgagtga ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct 60
ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
cttgcaccca tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtgggtc gcattaacgt agaaggtagc 180
acaaccgtta atacgccgcg tatgccgcgt aatttcagc agttcttcg tgatgattct 240

ES 2 692 811 T3

```

ccgttctgcc aggaagggttc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
ggtaatggtg gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttggtg ataacgcgac ggtcattaaa 420
gttcaactga gcgatggcgg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
gatatcgcgc tgatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
tctgatgcac tgcgcggtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccctgt tggctctggc 600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctcg ctagggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactccgg tggcgcgctg 720
gttaacctga acggcggaact gatcggtatc aacaccgcga tcctcgacc ggacggcggc 780
aacatcggtg tcggttttgc tatcccgagt aacatggtga aaaacctgac ctgcgagatg 840
gtggaatacg gccagggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc 900
gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
ggtaagccga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
agcaaaactg ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgct 1200
gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
ccggctcgcg agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

```

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

5 <213> E. coli

<400> 8

```

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

```

ES 2 692 811 T3

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			
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	

ES 2 692 811 T3

305											310											315											320
Pro	Asn	Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Gly	Asp	Val	Ile																		
				325													330																
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																												

<210> 9
<211> 1425
<212> ADN
<213> E. coli

<400> 9						
atgaaaaaaaa	ccacattagc	actgagtgca	ctggctctga	gtttaggttt	ggcgttatct	60
ccgctctctg	caacggcggc	tgagacttct	tcagcaacga	cagcccagca	gatgccaagc	120
cttgcaccca	tgctcgaaaa	ggtgatgcct	tcagtgggtc	gcattaacgt	agaaggtagc	180
acaaccgtta	atacgccgcg	tatgccgcgt	aatttccagc	agttcttcgg	tgatgattct	240
ccgttctgcc	aggaaggttc	tccgttccag	agctctccgt	tctgccaggg	tggccagggc	300
ggtaatggtg	gcggccagca	acagaaattc	atggcgctgg	gttccggcgt	catcattgat	360
gccgataaa	gctatgtcgt	caccaacaac	cacgttggtg	ataacgcgac	ggtcattaaa	420

ES 2 692 811 T3

```

gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
gatatcgcg c gatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaacccgtt tggctctgggc 600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacgccgg tgggtcgctg 720
gttaacctga acggcgaaact gatcgggtatc aacaccgcga tcctcgccacc ggacggcggc 780
aacatcggta tcgggttttgc tatcccgagt aacatgggtga aaaacctgac ctgcgagatg 840
gtggaatacg gccaggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaaactcc 900
gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcgggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
ggtaagccga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
cagcagagca gccagaatca gggtgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgct 1200
gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
ccggctgcgc agatcggcct gaagaaaggat gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

```

<210> 10

<211> 474

<212> PRT

5 <213> E. coli

<400> 10

```

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

```

ES 2 692 811 T3

85										90					95				
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Ala				
			100													110			
Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr				
			115													125			
Asn	Asn	His	Val	Val	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser				
			130													140			
Asp	Gly	Arg	Lys	Phe	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Arg	Ser				
				150														160	
Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Ile	Gln	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Thr	Ala	Ile				
				165														175	
Lys	Met	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Tyr	Thr	Val	Ala				
				180														190	
Ile	Gly	Asn	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Val				
			195													205			
Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Phe				
			210													220			
Ile	Gln	Thr	Asp	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gly	Asn	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu				
			225													235			
Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala				
				245														255	
Pro	Asp	Gly	Gly	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ser	Asn	Met				
				260														270	
Val	Lys	Asn	Leu	Thr	Ser	Gln	Met	Val	Glu	Tyr	Gly	Gln	Val	Lys	Arg				
				275														285	
Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	Met	Gly	Thr	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys				
			290													300			
Ala	Met	Lys	Val	Asp	Ala	Gln	Arg	Gly	Ala	Phe	Val	Ser	Gln	Val	Leu				
			305													315			
Pro	Asn	Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Gly	Asp	Val	Ile				
				325														335	

ES 2 692 811 T3

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

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hTNF40-gLI

<400> 11

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

10

ES 2 692 811 T3

65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

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

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> gh3h TNF40.4

<400> 12

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 Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cadena ligera injertada

<400> 13

ES 2 692 811 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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
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

<210> 14

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada injertada

<400> 14

ES 2 692 811 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 Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr 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 Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Ala Ala
225

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 15

gcatcataat ttcttttta cctc 24

<210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 16
 gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

10 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

15 <400> 17
 gtgccaggag atgcagcagc ttgc 24

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 18
 ttgcagcca gtcagaaagt g 21

25 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 19
 ctgcctgcga ttttcgccgg aacg 24

<210> 20
 <211> 24

35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 20
 40 cgcattgtac gtgccacgat atcc 24

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:
 - a. un gen Tsp mutado, en la que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica;
- 5 en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por el gen Tsp mutado y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.
2. Una célula según la reivindicación 1, en la que el gen Tsp mutado por desactivación génica comprende una mutación en el codón de iniciación génica y/o uno o más codones de terminación colocados en dirección 3' del codón de iniciación génica y en dirección 5' del codón de terminación génica.
- 10 3. Una célula según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la célula comprende un gen Tsp mutado por desactivación génica.
4. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula es la cepa MXE001 depositada en la National Collection of Type Cultures, HPA, RU con número de acceso NCTC13444.
5. Una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:
 - 15 a. un gen Tsp mutado, en la que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica; y
 - b. un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa, en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por los genes Tsp y DegP mutados y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.
- 20 6. Una célula según la reivindicación 5, en la que la célula es la cepa MXE005 depositada en la National Collection of Type Cultures, HPA, RU con número de acceso NCTC13448.
7. Una célula bacteriana gramnegativa recombinante que comprende:
 - a. un gen Tsp mutado, en la que el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene un 50 % o menos de la actividad proteasa de una Tsp no mutada de tipo silvestre o es un gen Tsp mutado por desactivación génica; y
 - 25 b. un gen ptr mutado por desactivación génica,
 en la que la célula es isogénica de una célula W3110 de *E. coli*, excepto por los genes Tsp y ptr mutados y opcionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.
8. Una célula según la reivindicación 7, en la que la célula es la cepa MXE004 depositada en la National Collection of Type Cultures, HPA, RU con número de acceso NCTC13447.
- 30 9. Una célula según cualquier reivindicación anterior, en la que el gen DegP mutado, el gen ptr mutado y/o el gen Tsp mutado se mutan para comprender uno o más sitios marcadores de restricción.
10. Una célula según la reivindicación 9, en la que el gen ptr mutado por desactivación génica y/o el gen Tsp mutado por desactivación génica se mutan para comprender un sitio marcador de restricción que comprende un codón de terminación en marco.
- 35 11. Una célula según la reivindicación 9, en la que el sitio marcador de restricción es un sitio de restricción *Ase I*.
12. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el gen ptr mutado por desactivación génica y/o el gen Tsp mutado por desactivación génica comprenden un sitio marcador de restricción creado por una mutación con cambio de sentido en el codón de iniciación génica opcionalmente una o más mutaciones puntuales adicionales.
- 40 13. Una célula según la reivindicación 12, en la que el sitio marcador de restricción es un sitio marcador *EcoR I*.
14. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 7, o 9 a 13, en la que el gen ptr mutado por desactivación génica comprende la SEQ ID NO: 6.
15. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el gen Tsp mutado por desactivación génica comprende la SEQ ID NO: 3.
- 45 16. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, o 9 a 15, en la que el gen DegP mutado

comprende la mutación S210A.

17. Una célula según la reivindicación 16, en la que el gen DegP mutado comprende la SEQ ID NO: 9.

18. Una célula según cualquier reivindicación anterior, en la que la célula comprende adicionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.

5 **19.** Una célula según la reivindicación 18, en la que la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés es exógena.

20. Una célula según la reivindicación 19, en la que la célula comprende un módulo de expresión o un vector que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés.

10 **21.** Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

22. Una célula según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico de TNF.

15 **23.** Un método para producir una proteína de interés recombinante que comprende expresar la proteína de interés recombinante en una célula bacteriana gramnegativa recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

Figura 1a

Ptr de tipo silvestre (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

Δptr 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 1b

Tsp de tipo silvestre 5'

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

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

ΔTsp 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 1c

DegP de tipo silvestre

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 mutado S210A

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

Figura 2

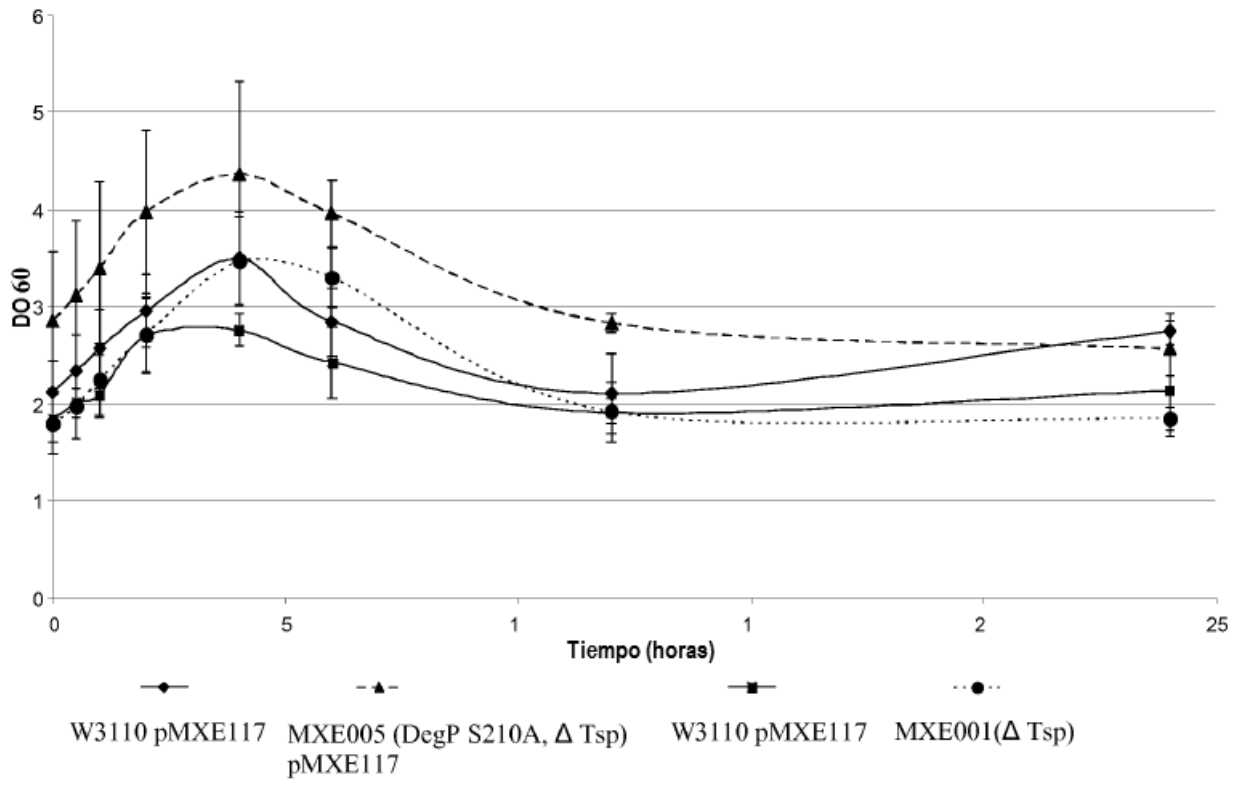


Figura 3

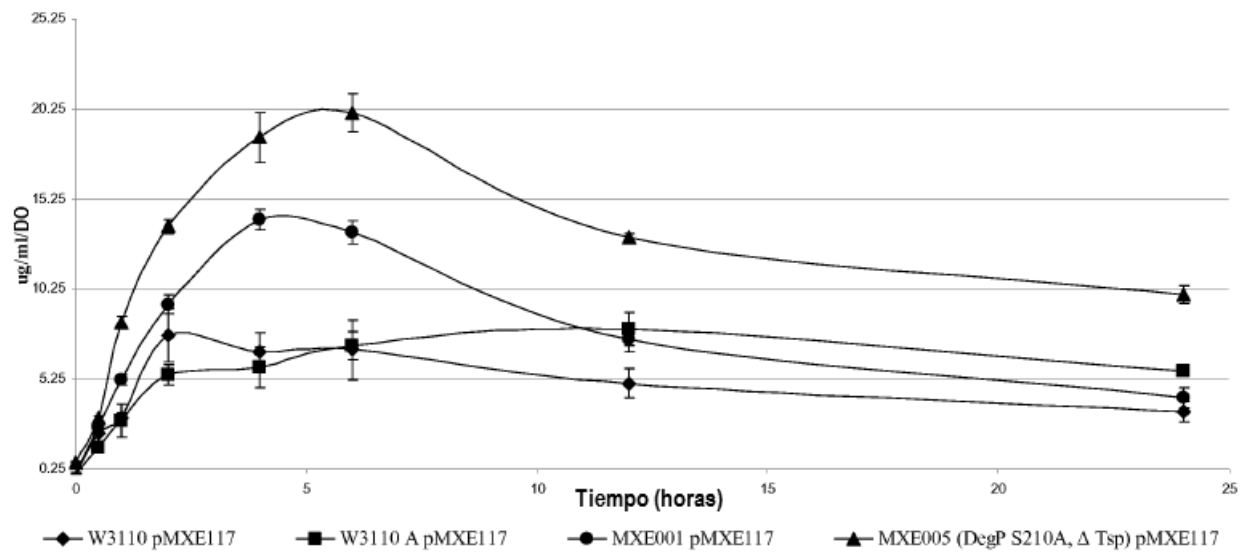


Figura 4

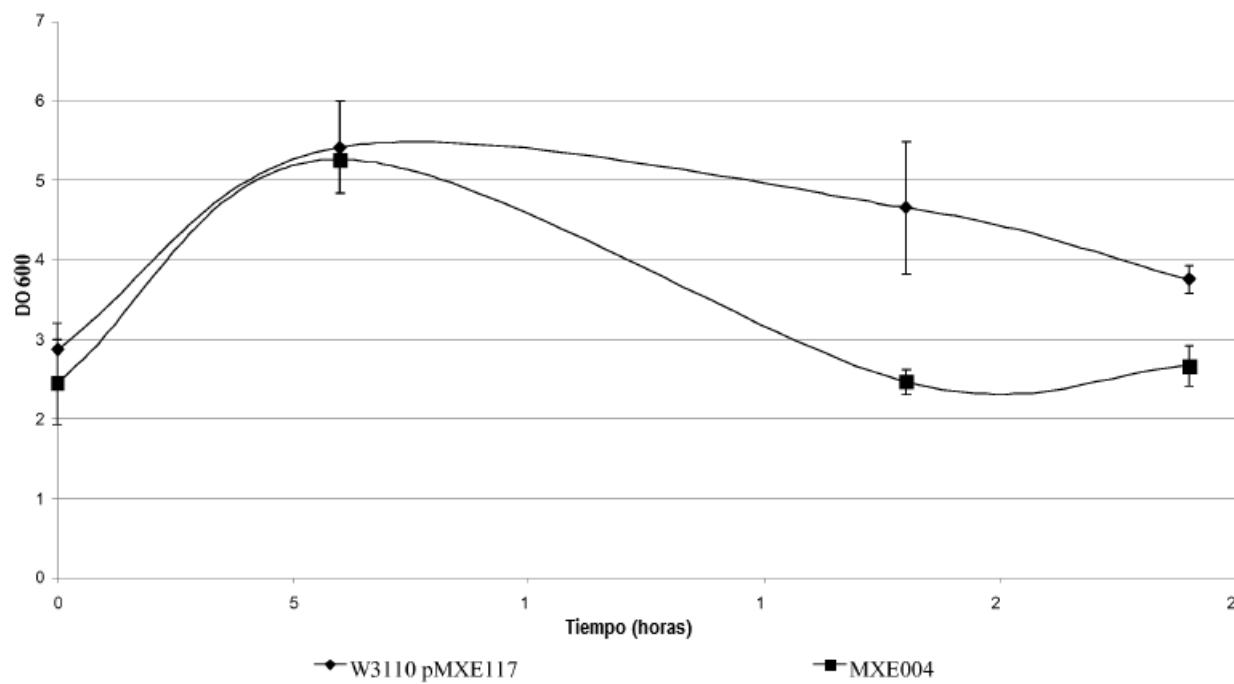


Figura 5

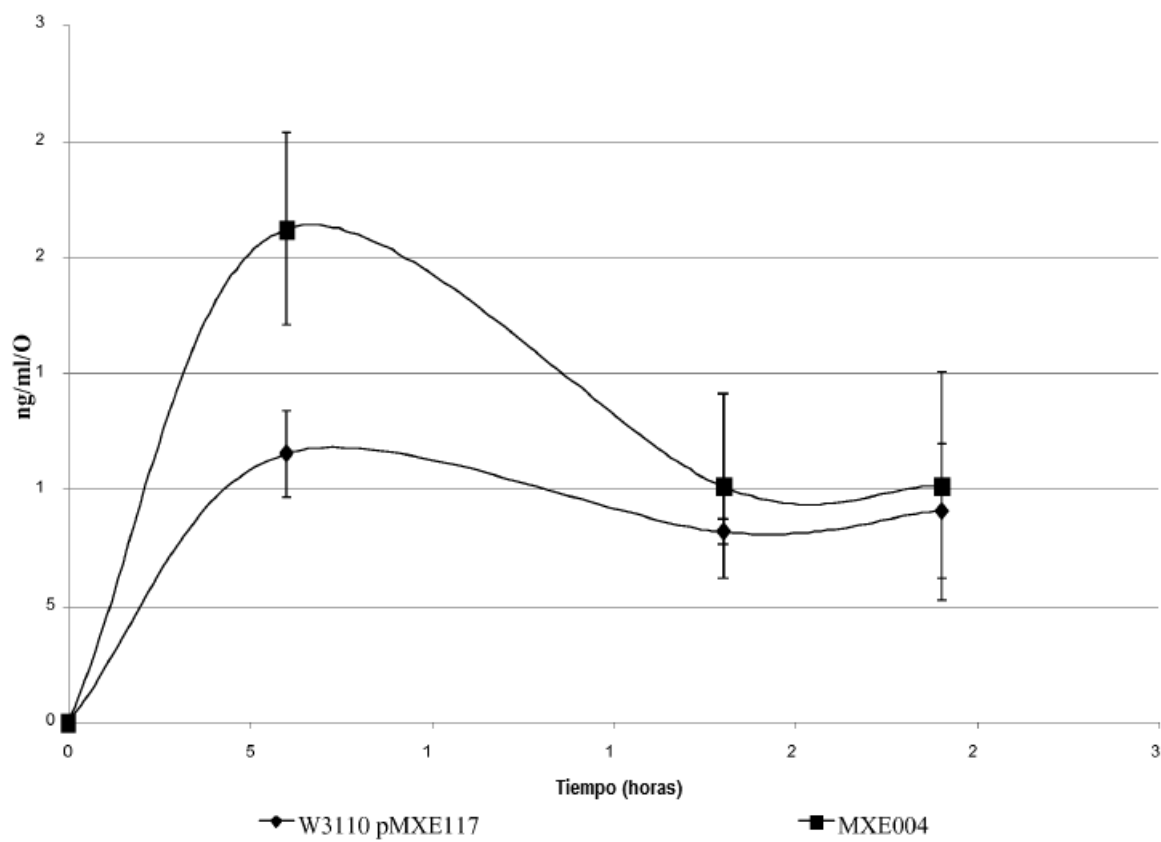


Figura 6

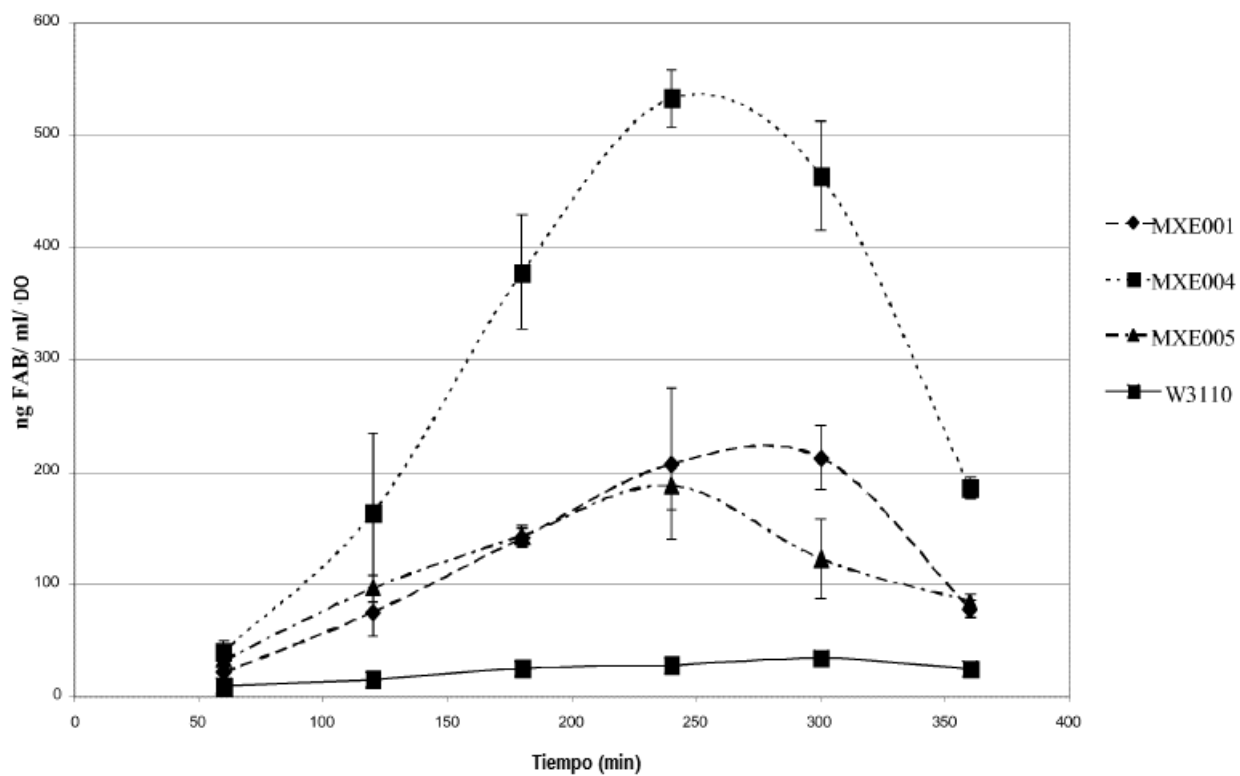


Figura 7

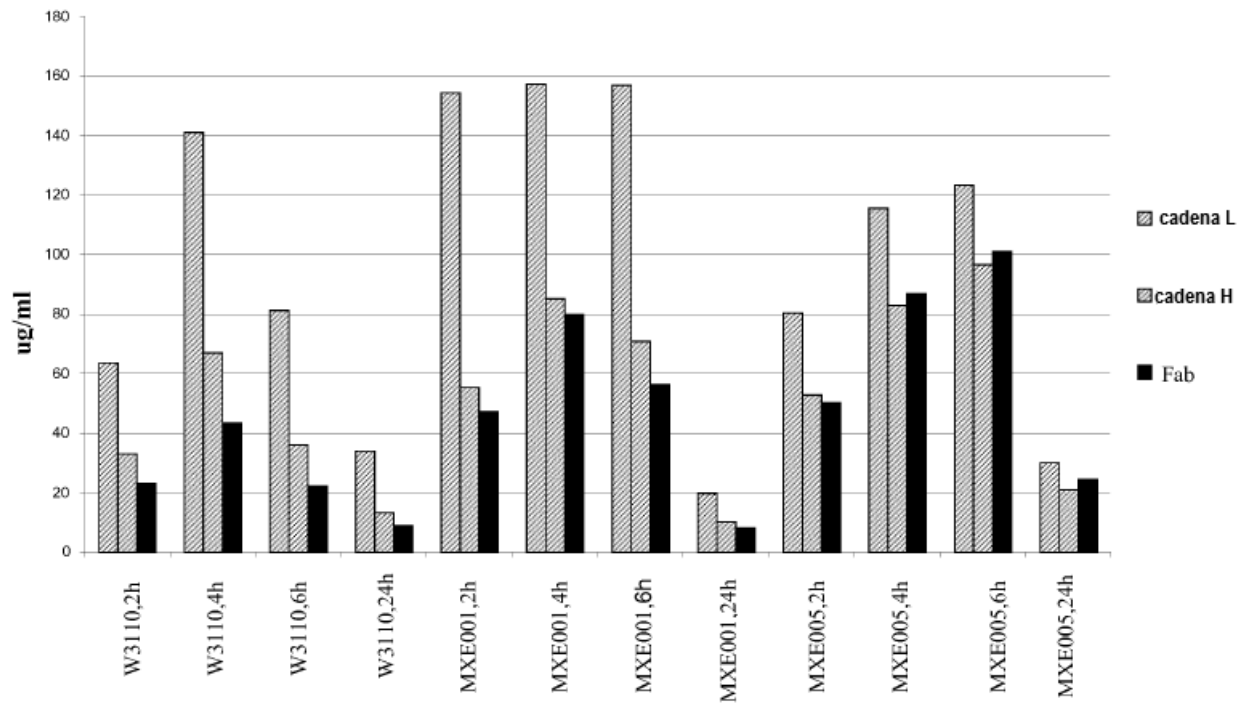
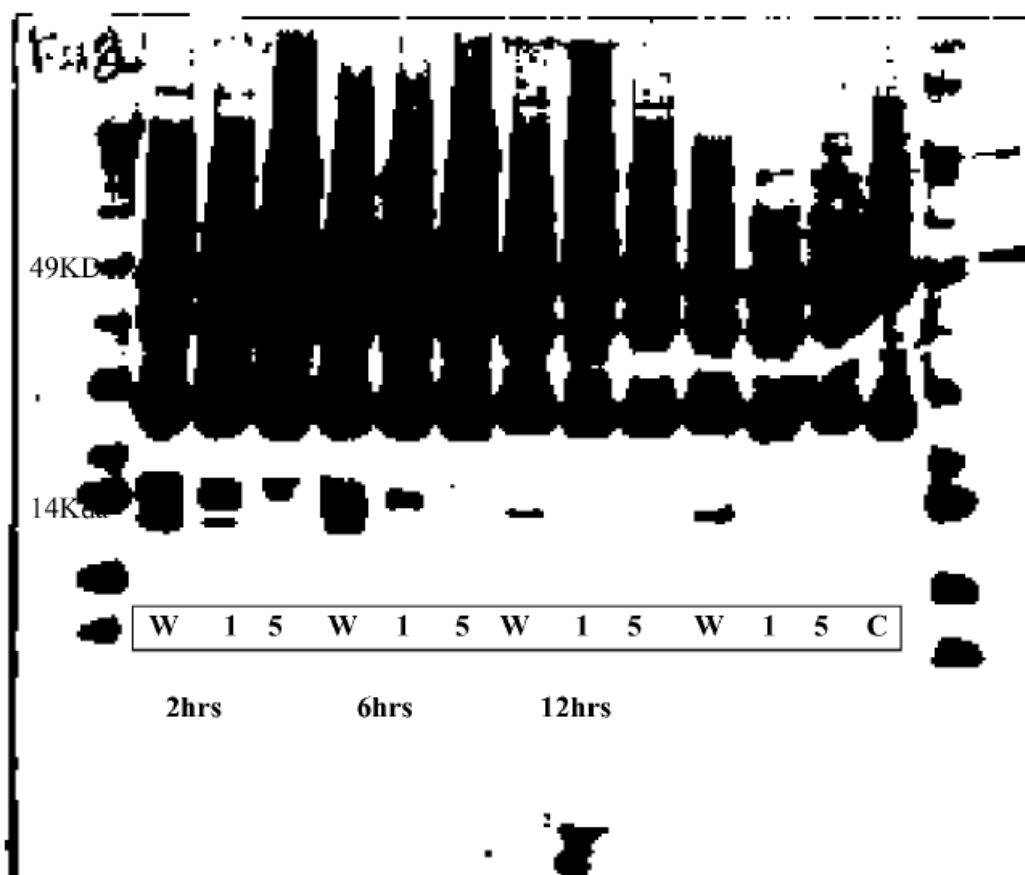


Figura 8



W = W3110  
 1 = MXE001 ( $\Delta$ Tsp)  
 5 = MXE005 ( $\Delta$ Tsp, DegP S210A)

Figura 9

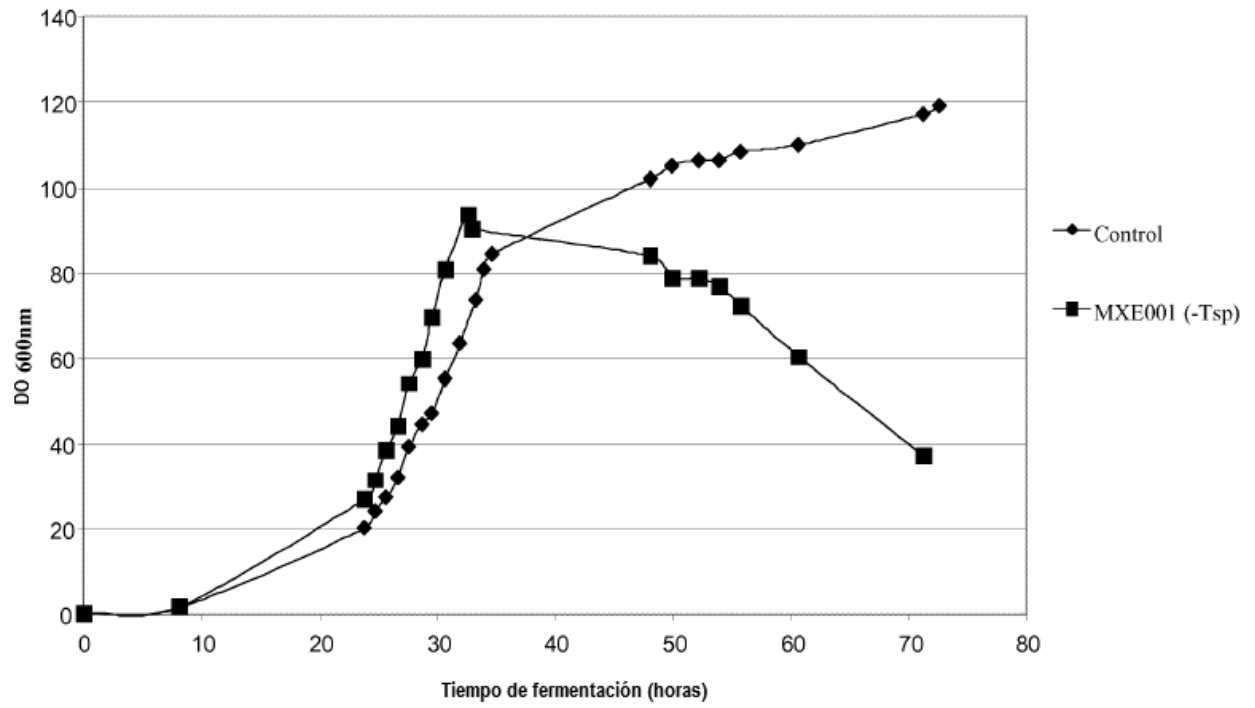


Figura 10

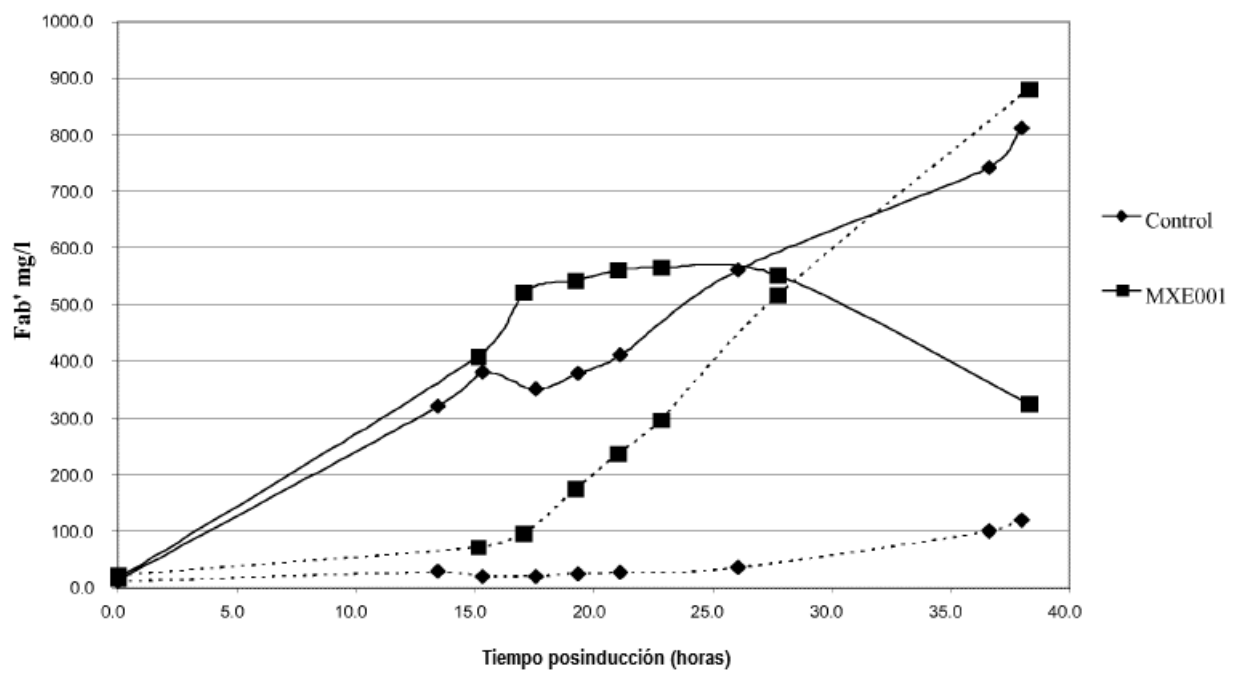


Figura 11

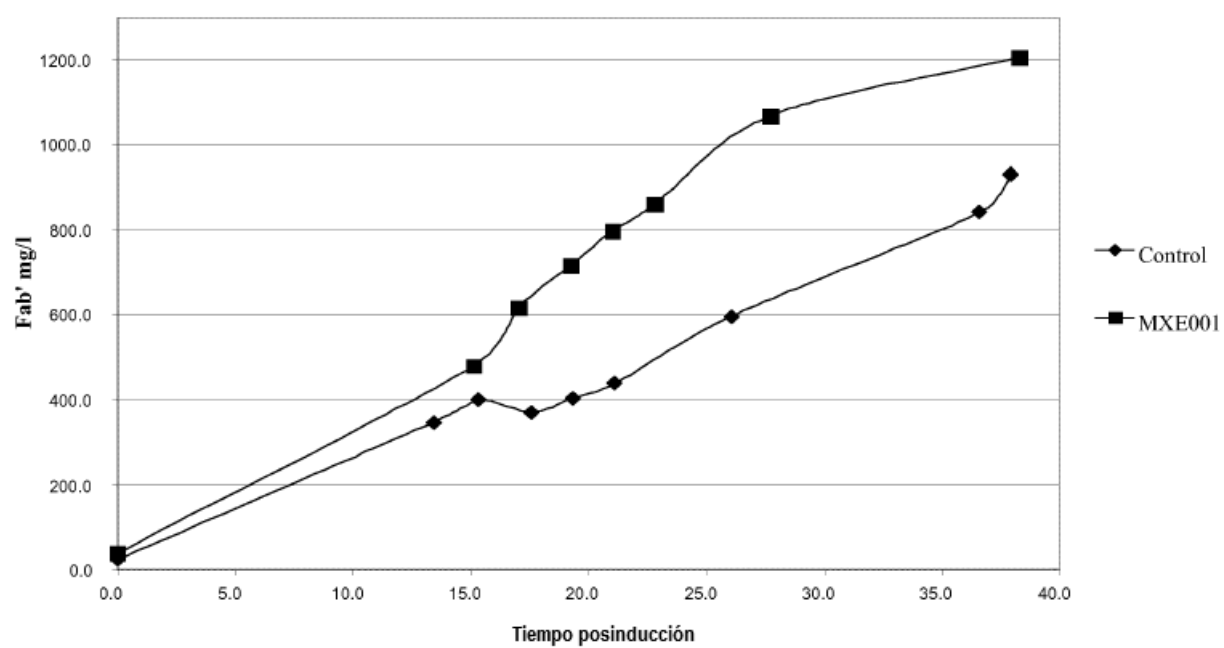


Figura 12

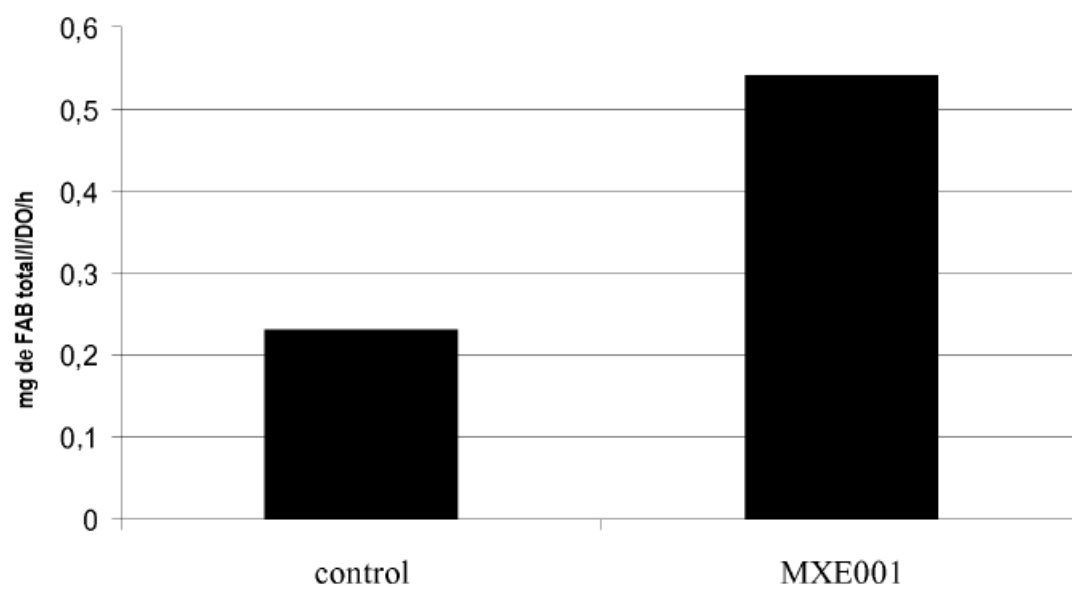


Figura 13

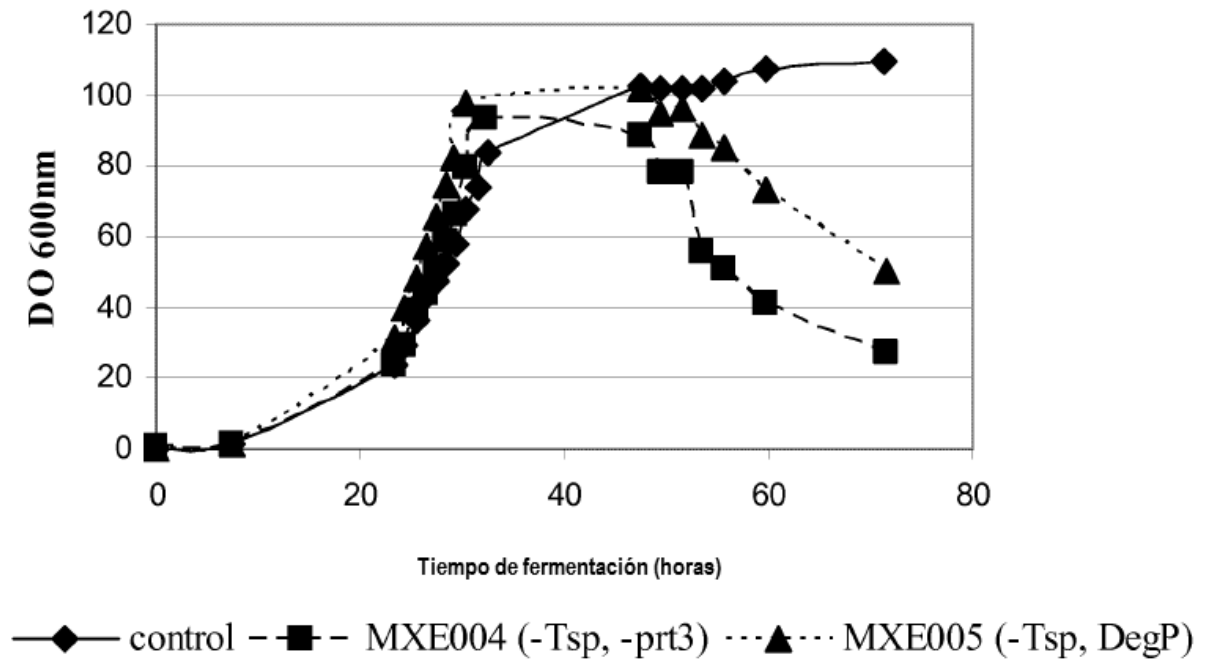


Figura 14

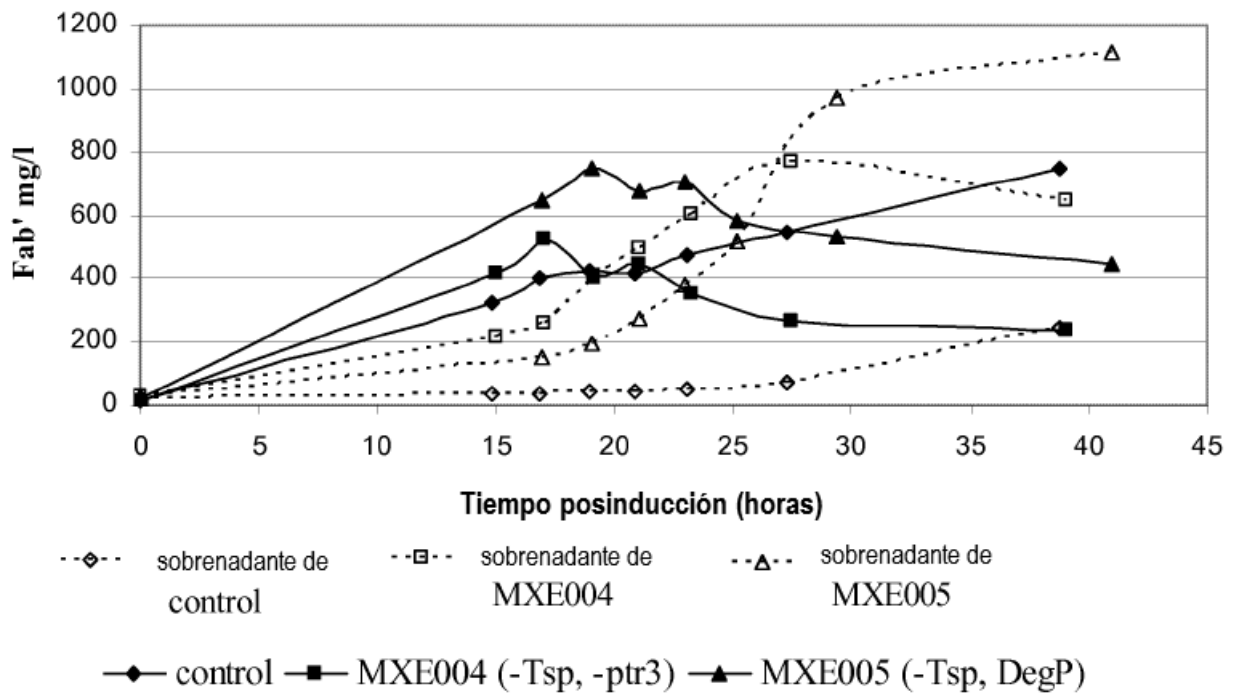


Figura 15

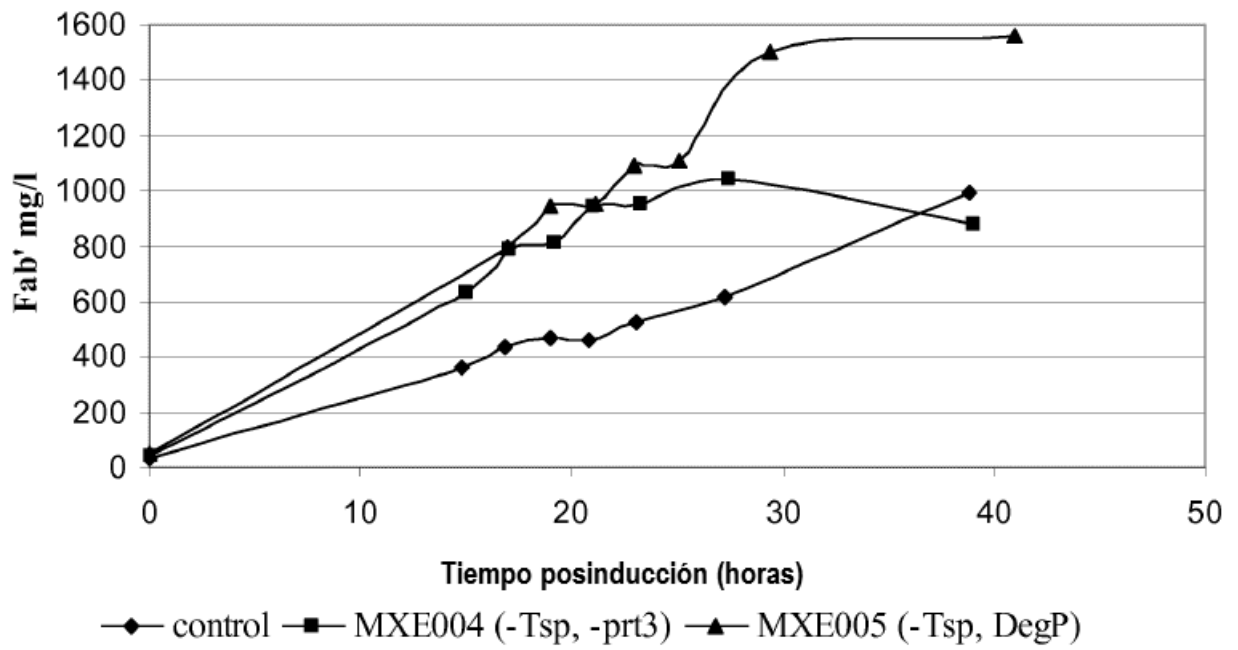


Figura 16

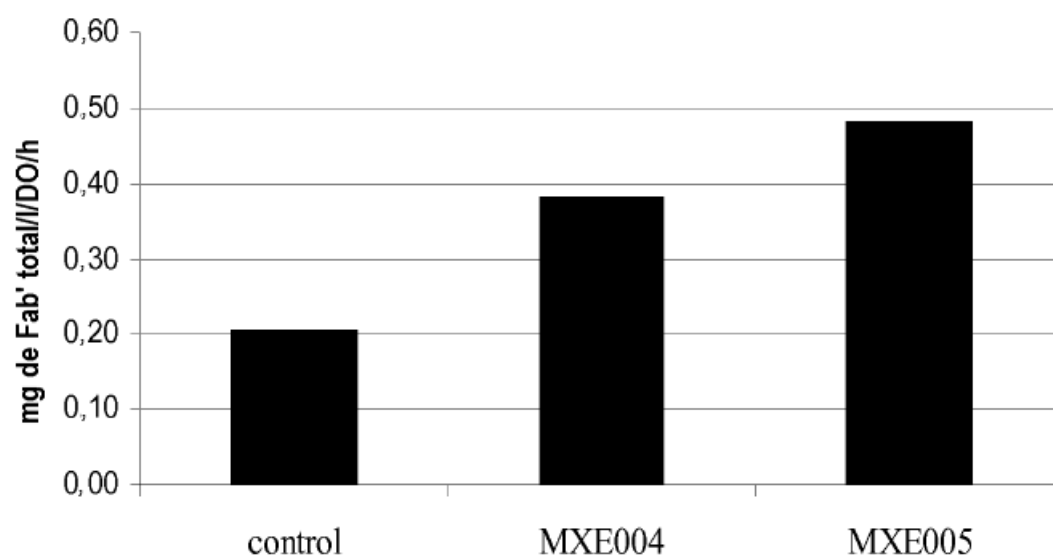


Figura 17

