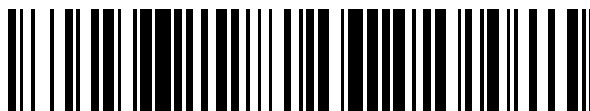


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 425**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/EP2013/059803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13171156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13723086 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2850100**

54 Título: **Célula anfitriona bacteriana recombinante para la expresión de proteínas**

30 Prioridad:

14.05.2012 GB 201208367

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

18.03.2019

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

BASSETT, PHILIP JONATHAN;

HUMPHREYS, DAVID PAUL y

PATEL, PARESHKUMAR MANJIBHAI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 704 425 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

Célula anfitriona bacteriana recombinante para la expresión de proteínas

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

5 **Antecedentes de la invención**

Las células bacterianas, tales como *E. coli*, se utilizan comúnmente para producir proteínas recombinantes. Hay muchas ventajas en el uso de células bacterianas, tales como *E. coli*, para producir proteínas recombinantes, particularmente debido a la naturaleza versátil de las células bacterianas como células anfitrionas que permiten la inserción de genes a través de plásmidos. *E. coli* se han utilizado para producir muchas proteínas recombinantes, incluyendo insulina humana.

A pesar de las muchas ventajas de utilizar células bacterianas para producir proteínas recombinantes, todavía existen limitaciones significativas, incluida la dificultad de producir proteínas sensibles a la proteasa. Las proteasas desempeñan un papel importante en el recambio de proteínas viejas, dañadas o mal plegadas en el periplasma y el citoplasma de *E. coli*. Las proteasas bacterianas actúan degradando la proteína recombinante de interés, lo que a menudo reduce significativamente el rendimiento de la proteína activa.

Se han identificado varias 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 y lon.

Tsp (también conocida como Prc) es una proteasa periplásmica de 60 kDa. El primer sustrato conocido de Tsp fue la proteína de unión a penicilina 3 (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.* 1989 Nov;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.* 1991 Aug;173 (15):4799-813) pero más tarde se descubrió que la Tsp también era capaz de escindir las proteínas de la cola del fago y, por lo tanto, se le cambió el nombre a Proteasa Específica de la 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) describen una cepa de delección de prc (KS1000) en donde la mutación se creó reemplazando un segmento del gen prc por un fragmento que comprende un marcador Kan^r.

La reducción de la actividad de Tsp (prc) es deseable para reducir la proteólisis de las proteínas de interés. Sin embargo, se encontró que las células que carecen de proteasa prc muestran un crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Hara et al. aislaron reversores termorresistentes que contenían mutaciones supresoras extragénicas (spr) (Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). Spr es una proteasa periplásmica unida a membrana de 18 kDa y los sustratos de spr son Tsp y peptidoglicanos en la membrana externa implicados en la hidrólisis de la pared celular durante la división celular. El gen spr se denomina UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (SPR_ECOLI).

Se han descrito cepas mejoradas deficientes en proteasa que comprenden un gen spr mutante. Chen et al describen la construcción de cepas de *E. coli* que portan diferentes combinaciones de mutaciones en prc (Tsp) y otra proteasa, DegP, creadas amplificando las regiones aguas arriba y aguas abajo del gen y ligando estas entre sí en un vector que comprende marcadores de selección y una mutación sprW174R (la acumulación de alto nivel de un fragmento de anticuerpo recombinante en el periplasma de *Escherichia coli* requiere una cepa anfitriona triple mutante (Δ DegP Δ prc sprW174R) (Chen C, Snedecor B, Nishihara JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Campeón KM. *Biotechnol Bioeng.* 5 de marzo de 2004; 85(5):463-74). Se encontró que la combinación de las mutaciones Δ DegP, Δ prc y sprW174R proporcionaba los niveles más altos de cadena ligera de anticuerpo, cadena pesada de anticuerpo y F(ab')₂-LZ. El documento EP1341899 describe 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 los fenotipos de crecimiento exhibidos por las cepas que albergan mutantes de prc.

Otras cepas mejoradas deficientes en proteasas que contienen mutaciones en Tsp y spr se han descrito en el documento WO2011/086136, y en el documento WO 2012/013930.

Las cepas descritas en el documento WO02/48376 son lac⁻ y no puede crecer en cultivos donde se emplee timidina, fucosa o maltosa como fuente de carbono. Esto puede ser una grave desventaja para las cepas destinadas a su uso a escala comercial. Puede haber desventajas adicionales asociadas con las cepas, por ejemplo, la falta de producción de fosfatasa alcalina. Esta última es una proteína periplásmica implicada en la utilización de fosfato de los medios de cultivo.

Ciertas proteínas exhiben actividad peptidil-prolil isomerasa y/o isomerasa y/o actividad chaperona y se ha encontrado que proporcionan propiedades ventajosas cuando se emplean en líneas celulares empleadas para la expresión de proteínas recombinantes.

La presente invención proporciona nuevas cepas bacterianas que portan mutaciones tanto Tsp como spr y al menos un gen que codifica una proteína o proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas que proporcionan medios ventajosos para producir proteínas recombinantes.

Compendio de la invención

- 5 En la presente memoria se describe una célula bacteriana gram negativa recombinante que comprende:
- a. un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 y G147 y
 - 10 b. un gen o genes capaces de expresar o expresar en exceso una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID

en donde la célula ha reducido la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje.

Adicionalmente se describe una célula bacteriana gram negativa recombinante que codifica:

- 15 a. un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 y G147,
- b. un gen o genes capaces de expresar o expresar en exceso una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIID,
- c. un gen capaz de expresar una proteína de interés, por ejemplo un anticuerpo o fragmento de unión del mismo

20 en donde la célula ha reducido la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje y el resto del ADN genómico celular es isogénico con respecto a la célula de tipo salvaje de la que se obtuvo la célula recombinante.

25 En un caso, el genoma de la célula es isogénico con respecto a una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto para el gen spr mutado, la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje y el gen o genes que expresan una proteína capaz de facilitar el plegamiento de la proteína.

30 En la presente memoria se describe adicionalmente una célula bacteriana gram negativa recombinante que tiene una actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje y que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr, en donde el genoma de la célula es isogénico con respecto a una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto para la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje, el gen spr mutado y el gen o genes introducidos para expresar una proteína capaz de facilitar el plegamiento de la proteína.

Las células descritas en la presente memoria muestran ventajosos fenotipos de producción de proteínas y crecimiento.

35 Adicionalmente, se describe en la presente memoria un método para producir una proteína de interés que comprende expresar la proteína de interés en una célula bacteriana gram negativa recombinante como se define anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

40 **Figura 1** muestra los resultados de las fermentaciones en la escala de 5 L realizadas con varias combinaciones de células anfitrionas y "chaperona". W3110 es una cepa de *E. coli* de tipo salvaje. Las diversas combinaciones fueron: tipo salvaje sin chaperona; tipo salvaje con FkpA y Skp; spr mutante MXE016 y Δ Tsp como se publicó en el documento WO2011/086136; MXE016 y FkpA; MXE016 y Skp; MXE016 y FkpA y Skp; MXE017 descrito en el documento WO2011/086136; MXE017 y FkpA y Skp

45 **Figura 2** muestra los resultados de los experimentos de variación de la velocidad de alimentación a velocidades de alimentación posteriores a la inducción de 5,4, 6,0 y 7,0 g/h, para MXE016, la mayoría del Fab' adicional obtenido a velocidades de alimentación más altas se perdió en el sobrenadante.

Figuras 3A, B muestran la viabilidad celular (3A) y los títulos de Fab' (3B) para MXE016 +/- FkpA.

Figura 4 muestra los datos de recuperación primarios para la producción a escala piloto de 20 L.

50 **Figura 5** muestra la recuperación primaria en gel teñido con SDS-PAGE en condiciones no reductoras de

una producción a escala piloto de 20 L. Aparte de las bandas relacionadas con FkpA, el perfil de la proteína parece muy similar entre las dos cepas.

- 5 **Figura 6** muestra una transferencia Western de etiqueta de His en condiciones no reductoras para un procedimiento a escala piloto de 20 L. Se detectó FkpA completa y correspondía a la banda de aprox. 30 kDa y no se detectó ninguna señal en MXE016 sola como se esperaba.
- Figura 7A-C** muestra diversas mutaciones en diversos genes.
- Figura 7D** muestra una representación esquemática de la creación de un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo (LC), una cadena pesada de un anticuerpo (HC), una secuencia de polinucleótidos FkpA y/o un polinucleótido Skp
- 10 **Figura 8** Muestra varias secuencias de polinucleótidos y aminoácidos.

Breve descripción de las secuencias

- SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN del gen Tsp de tipo salvaje que incluye los 6 nucleótidos ATGAAC aguas arriba del codón de inicio.
- SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Tsp de tipo salvaje.
- 15 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ADN de un gen Tsp desactivado mutado que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codón de inicio.
- SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ADN del gen de la proteasa III de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Proteasa III de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN de un gen de proteasa III desactivado mutado.
- 20 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN del gen DegP de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína DegP de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ADN de un gen DegP mutado.
- SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de una proteína DegP mutada.
- 25 SEQ ID NO: 11 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- SEQ ID NO: 12 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- SEQ ID NO: 13 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- 30 SEQ ID NO: 14 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen de la proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- SEQ ID NO: 15 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen de la proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- 35 SEQ ID NO: 16 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción AseI.
- SEQ ID NO: 17 es la secuencia de ADN del gen spr de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 18 es la secuencia del gen spr de tipo salvaje que incluye la secuencia señal que consiste en los primeros 26 residuos de aminoácido.
- SEQ ID NO: 19 es la secuencia del gen spr no mutado sin la secuencia de señal.
- 40 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia OmpT mutada que comprende mutaciones D210A y H212A.
- SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de una secuencia OmpT mutada que comprende mutaciones D210A y H212A.
- SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia OmpT desactivada mutada.

SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia del adaptador oligonucleotídico OmpA.

SEQ ID NO: 24 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 1 (IGS1) para la expresión de Fab en *E. coli*.

5

SEQ ID NO: 25 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 2 (IGS2) para la expresión de Fab en *E. coli*.

SEQ ID NO: 26 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 3 (IGS3) para la expresión de Fab en *E. coli*.

SEQ ID NO: 27 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 4 (IGS4) para la expresión de Fab en *E. coli*.

10

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de ADN del gen FkpA de tipo salvaje.

SEQ ID NO: 29 es la secuencia de proteínas del gen FkpA de tipo salvaje.

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de ADN del gen FkpA etiquetado con his.

SEQ ID NO: 31 es la secuencia de proteínas del gen FkpA etiquetado con his.

SEQ ID NO: 32 es la secuencia de ADN del gen *skp* de tipo salvaje.

15

SEQ ID NO: 33 es la secuencia de proteínas del gen *skp* de tipo salvaje.

SEQ ID NO: 34 es la secuencia de ADN del gen *skp* etiquetado con his.

SEQ ID NO: 35 es la secuencia de proteínas del gen *skp* etiquetado con his.

20

SEQ ID NO: 36 a 74 muestran varias secuencias de aminoácidos y ADN de anticuerpos contra FcRn o fragmentos de los mismos, que son adecuados para la expresión en la línea celular de la presente invención. En particular, SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-FcRn de cadena ligera 1519gH20 y SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-FcRn de cadena pesada 1519gH20.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

25

Los autores de la presente invención han proporcionado células bacterianas gram negativas recombinantes mejoradas adecuadas para expresar una proteína recombinante de interés.

En una realización, la proteína es un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, en particular un anticuerpo terapéutico.

30

En particular, los autores de la presente invención han proporcionado células bacterianas gram negativas recombinantes mejoradas adecuadas para expresar una proteína recombinante de interés incorporando uno o más genes, que codifican una proteína para facilitar el plegamiento de proteínas, en células bacterianas gram negativas que portan un gen *Tsp* mutado y un gen *spr* mutado.

35

En una realización, el gen o los genes, que codifican la proteína para facilitar el plegamiento de la proteína, se integran en el genoma de las células, por ejemplo para proporcionar una línea celular estable. En una realización, una proteína recombinante para su expresión (tal como una proteína terapéutica) se transfecta a una línea celular estable para proporcionar la expresión de la proteína recombinante deseada.

40

En una realización, el gen o los genes, que codifican una proteína para facilitar el plegamiento de proteínas, se proporcionan en uno o más plásmidos, por ejemplo, los plásmidos se transfectan transitoriamente a una célula para proporcionar una línea celular de la presente descripción.

En una realización, el gen o los genes, que codifican una proteína para facilitar el plegamiento de proteínas, se proporcionan en un plásmido que también contiene la secuencia codificante para una proteína recombinante de interés.

45

En una realización, el gen o los genes, que codifican una proteína para facilitar el plegamiento de proteínas, se proporcionan en un plásmido que no contiene la secuencia codificante para una proteína recombinante de interés.

En una realización, la invención proporciona nuevas cepas que tienen un fenotipo de crecimiento celular mejorado en comparación con células bacterianas de tipo salvaje y células que portan solo un gen *Tsp* mutado o un gen *Tsp* mutado y un gen *spr* mutado.

Las células de la presente invención poseen muchas ventajas. Los autores de la presente invención han encontrado

sorprendentemente que las células de acuerdo con la presente descripción pueden exhibir una mayor viabilidad celular en comparación con una célula de tipo salvaje o una célula que comprende un gen Tsp mutado y un gen spr mutado.

5 La viabilidad celular tiene una particular importancia en términos prácticos porque las células que no son viables tienden a lisar y crear residuos de ADN en el cultivo. Estos residuos de ADN aumentan la dificultad, el coste y el gasto de purificar la proteína deseada. Por lo tanto, minimizar los residuos de ADN de las células no viables lisadas es un problema importante en la fabricación de proteínas recombinantes de manera eficaz, véase por ejemplo el documento US 6.258.560.

10 La viabilidad celular se puede medir mediante una cualquiera de varias técnicas de rutina, por ejemplo, empleando un colorante fluorescente y un análisis FACS o similar.

Específicamente, las células de acuerdo con la descripción generalmente exhiben un fenotipo de lisis celular reducida en comparación con las células que portan un gen Tsp mutado y un gen spr mutado.

15 Además, las nuevas cepas pueden reducir la pérdida de proteínas de las células y permitir una acumulación periplásmica prolongada en comparación con las células que portan un gen Tsp mutado y un gen spr mutado. Esto es particularmente importante porque, por ejemplo, cuando los niveles de expresión totales de la proteína diana son similares pero se acumula más proteína en el periplasma o se acumula menos proteína en el sobrenadante porque la cepa es menos permeable que las células con estas propiedades menos permeables, generalmente serán más adecuadas para la producción a escala de planta puesto que facilitan la recuperación de proteínas.

20 Adicionalmente, las células de acuerdo con la presente descripción pueden mostrar un mayor rendimiento de una proteína de interés en comparación con una célula bacteriana de tipo salvaje o una célula que comprende un gen Tsp mutado y un gen spr mutado en ausencia de un gen o genes que codifican una proteína tal como FkpA. El rendimiento de proteína mejorado puede ser el rendimiento de proteína periplásmica y/o el rendimiento de proteína sobrenadante. En una realización, las células de la presente invención muestran un rendimiento mejorado de la proteína periplásmica en comparación con una célula que porta un gen Tsp mutado y un gen spr mutado debido a una filtración reducida de la célula.

25 Las células bacterianas recombinantes pueden ser susceptibles de una mayor velocidad de producción de una proteína de interés y, por lo tanto, la misma cantidad de una proteína de interés se puede producir en un tiempo más corto en comparación con una célula bacteriana de tipo salvaje o una célula que comprende un gen Tsp mutado y un gen spr mutado. La mayor velocidad de producción de una proteína de interés puede ser especialmente significativa durante el período inicial de crecimiento de la célula, por ejemplo durante las primeras 5, 10, 20 o 30 horas después de la inducción de la expresión de proteínas.

30 Las células de acuerdo con la presente invención expresan preferiblemente un rendimiento máximo en el periplasma y/o medio de aproximadamente 1,0 g/l, 1,5 g/l, 1,8 g/l, 2,0 g/l, 2,4 g/l, 2,5 g/l, 3,0 g/L, 3,5 g/L o 4,0 g/L de una proteína de interés.

35 Además, la expresión de una proteína o proteínas que facilitan el plegamiento optimiza adicionalmente la expresión al maximizar la proteína proporcionada con un plegamiento adecuado. El experto en la técnica es consciente de que el plegamiento apropiado es esencial para la función biológica y, por lo tanto, el aislamiento de la proteína con el plegamiento deseado es de vital importancia. Esto es particularmente importante cuando la proteína se expresa en una célula gram negativa puesto que la proteína expresada no será natural para la célula y, por lo tanto, la célula puede no expresar automáticamente la proteína con el plegamiento adecuado. El plegamiento inadecuado puede expresarse en forma de agregación u otras impurezas. El aislamiento de la proteína deseada puede requerir una purificación extensa, lo que tiene implicaciones de coste y también puede dar como resultado un bajo rendimiento de la proteína deseada. Maximizar la cantidad de proteína plegada correctamente expresada minimiza la cantidad de purificación requerida y puede optimizar el rendimiento utilizable y, por lo tanto, es ventajoso.

45 Las ventajas asociadas con la expresión de una proteína que facilita el plegamiento incluyen uno o más de los siguientes: Título más alto (p.ej., aumentado a aproximadamente 1,05 g/L en comparación con 0,5 g/L del tipo salvaje); Mayor viabilidad en la cosecha (p.ej., >95%); Mayor título con mayor velocidad de alimentación (mejores perspectivas para el desarrollo del procedimiento); Títulos más altos a escalas de producción comercial, tales como una escala de 20 litros y una mayor viabilidad en la cosecha; y Un aclarado más fácil del extracto, en particular a una escala de 20 L.

55 Las células proporcionadas por la presente invención tienen una actividad proteasa reducida de Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje, lo que puede reducir la proteólisis de una proteína de interés, particularmente proteínas de interés que son proteolíticamente sensibles a Tsp. Por lo tanto, las células proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un mayor rendimiento de las proteínas intactas, preferiblemente de la proteína de interés y un rendimiento más bajo, o preferiblemente ningún fragmento proteolítico de proteínas, preferiblemente de la proteína de interés, en comparación con una célula bacteriana de tipo salvaje.

En la presente memoria se describen células que portan solo las mutaciones mínimas del genoma requeridas para

introducir las modificaciones de acuerdo con la presente descripción. La célula bacteriana puede diferir solo de una célula bacteriana de tipo salvaje en una o más mutaciones del gen spr y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje debido a que, por ejemplo, el gen o los genes que codifican una proteína para facilitar el plegamiento de proteínas puede introducirse transitoriamente en la célula, tal como en un plásmido. Las células descritas en la presente memoria no portan ninguna otra mutación que pueda tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento de la célula y/o su capacidad para expresar una proteína de interés.

Por consiguiente, una o más de las células anfitrionas recombinantes descritas en la presente memoria pueden exhibir una expresión de proteína mejorada y/o características de crecimiento mejoradas en comparación con las células que comprenden mutaciones realizadas mediante ingeniería genética adicionales de la secuencia genómica. Las células descritas en la presente memoria también son más adecuadas para su uso para producir proteínas terapéuticas en comparación con células que comprenden alteraciones adicionales en el genoma celular.

El experto en la técnica podría fácilmente someter a prueba un clon de célula candidato para ver si tiene el rendimiento deseado de una proteína de interés utilizando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo un método de fermentación, ELISA y HPLC con proteína G. Los métodos de fermentación adecuados son descritos por Humphreys D P, et al. (1997). en 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, septiembre de 2001; y Horn U. Strittmatter W. Krebber A. Knupfer U. Kujau M. Wenderoth R. Muller K. Matzku S. Pluckthun A. Riesenber 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 experto en la técnica también podría someter a prueba fácilmente la proteína secretada para ver si la proteína se pliega correctamente utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC con proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medición de afinidad de epítopos.

La presente invención se describirá ahora con más detalle.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. Se pretende que "Péptido" se refiera a 10 aminoácidos o menos.

El término "polinucleótido" incluye un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm, etc., a menos que el contexto indique lo contrario.

'Actividad reducida', como se emplea en la presente memoria, se refiere a 'niveles más bajos de actividad enzimática, tal como la actividad enzimática de Tsp en comparación con la actividad enzimática correspondiente en una cepa de tipo salvaje cuando se mide en condiciones comparables en un ensayo adecuado. En una realización, la actividad reducida es 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos o 5% o menos de la actividad enzimática de un comparador de tipo salvaje. En una realización, el análisis para determinar los niveles de actividad enzimática se realiza concomitantemente cuando los resultados se van a emplear en una comparación directa.

Comparación directa, como se emplea en la presente memoria, se refiere al lugar donde se compara el valor numérico de dos o más resultados con el propósito de evaluar si hay una actividad reducida como se define en la presente memoria o clasificar los resultados de actividad obtenidos de un ensayo.

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

Célula de tipo salvaje, como se emplea en la presente memoria, se emplea indistintamente con una célula no mutada o una célula de control.

La célula no mutada o la célula de control en el contexto de la presente invención significan una célula del mismo tipo que la célula gram negativa recombinante de la invención en donde la célula no ha sido modificada para portar la actividad de la proteína Tsp reducida anteriormente y para portar el gen spr mutante. Por ejemplo, una célula no mutada puede ser una célula de tipo salvaje y se puede obtener de la misma población de células anfitrionas que las células de la invención antes de la modificación para introducir cualquier mutación.

Las expresiones "célula", "línea celular", "cultivo celular" y "cepa" se utilizan indistintamente.

La expresión "fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado" en el contexto de la presente invención significa el fenotipo mostrado por una célula que tiene un gen Tsp mutante. Normalmente, las células que comprenden un gen Tsp mutante se pueden lisar, especialmente a altas densidades celulares. La lisis de estas

células hace que cualquier proteína recombinante se filtre al sobrenadante. Las células que portan el gen Tsp mutado también pueden mostrar un crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Por ejemplo, las células no presentan una tasa de crecimiento reducida o nula o las células mueren en medios hipotónicos a alta temperatura, tal como a 40°C o más.

5 El término "isogénico" en el contexto de la presente invención significa que el genoma de la célula de la presente invención tiene sustancialmente la misma o la misma secuencia genómica en comparación con la célula de tipo salvaje a partir de la que se obtiene la célula, excepto por un gen spr mutado y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje. En esta realización, el genoma de la célula no comprende otras mutaciones no naturales o realizadas mediante ingeniería genética. En una realización, la
10 célula de acuerdo con la presente invención puede tener sustancialmente la misma secuencia genómica en comparación con la célula de tipo salvaje, excepto por el gen spr mutado y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje, teniendo en cuenta cualquier mutación natural que se pueda producir. En una realización, la célula según la presente invención puede tener exactamente la misma secuencia genómica en comparación con la célula de tipo salvaje, excepto por el gen spr mutado y la
15 modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje.

El término "tipo salvaje" en el contexto de la presente invención significa una cepa de una célula bacteriana gram negativa como puede aparecer en la naturaleza o se puede aislar del medio ambiente, que no porta ninguna mutación realizada mediante ingeniería genética. Un ejemplo de una cepa de tipo salvaje de *E. coli* es W3110, tal como la cepa W3110 K-12.

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

Un inconveniente asociado con las cepas bacterianas deficientes en proteasas creadas previamente y utilizadas para expresar proteínas recombinantes es que comprenden mutaciones adicionales de genes implicados en el metabolismo celular y la replicación del ADN tales como, por ejemplo, *phoA*, *fhuA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* y *pro* en cepas de *E. coli*. Estas mutaciones pueden tener muchos efectos perjudiciales sobre la célula anfitriona, incluyendo
30 los efectos sobre el crecimiento celular, la estabilidad, el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes y la toxicidad. Las cepas que tienen una o más de estas mutaciones genómicas, particularmente las que tienen un alto número de estas mutaciones, pueden exhibir una pérdida de adaptabilidad que reduce la tasa de crecimiento bacteriano a un nivel que no es adecuado para la producción industrial de proteínas. Adicionalmente, cualquiera de las mutaciones genómicas anteriores puede afectar a otros genes en *cis* y/o en *trans* en formas dañinas impredecibles, lo que altera el fenotipo de la cepa, la adaptabilidad y el perfil de proteínas. Adicionalmente, el uso de células altamente mutadas no es generalmente adecuado para producir proteínas recombinantes para uso
35 comercial, particularmente terapéuticas, porque tales cepas generalmente tienen vías metabólicas defectuosas y, por lo tanto, pueden crecer poco o nada en medios mínimos o químicamente definidos.

40 En una realización, una célula de acuerdo con la presente invención es isogénica con respecto a una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto por el gen spr mutado y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje. Solo se realizan mutaciones mínimas en el genoma de la célula para introducir las mutaciones. Las células no portan ninguna otra mutación que pueda tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento de la célula y/o la capacidad de expresar una proteína de interés. Por consiguiente, una o más de las células anfitrionas recombinantes de la presente invención pueden exhibir una
45 expresión de proteína mejorada y/o características de crecimiento mejoradas en comparación con las células que comprenden otras mutaciones realizadas mediante ingeniería genética en la secuencia genómica. Las células proporcionadas por la presente invención también son más adecuadas para su uso en la producción de proteínas terapéuticas en comparación con células que comprenden alteraciones adicionales en el genoma celular.

50 En una realización preferida, la célula es isogénica con respecto a una célula de *E. coli* de tipo salvaje, tal como la cepa W3110, excepto por el gen spr mutado y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje.

La célula de la presente invención puede diferir adicionalmente de una célula de tipo salvaje al comprender un polinucleótido que codifica la proteína de interés. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés puede ser exógena o endógena. El polinucleótido que codifica la proteína de interés puede estar contenido dentro de un vector de expresión adecuado transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula anfitriona. En la
55 realización donde el polinucleótido que codifica la proteína de interés se inserta en el genoma del anfitrión, la célula de la presente invención también se diferenciará de una célula de tipo salvaje debido a la secuencia de polinucleótido insertada que codifica la proteína de interés. Preferiblemente, el polinucleótido está en un vector de expresión en la célula, causando así una interrupción mínima del genoma de la célula anfitriona.

La proteína spr es una proteasa periplásmica unida a membrana de *E. coli*.

La secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la proteína spr se muestra en SEQ ID NO: 21 con la secuencia señal en el extremo N y en SEQ ID NO: 22 sin la secuencia señal de 26 aminoácidos (según el Número de Acceso UniProt P0AFV4). La numeración de aminoácidos de la secuencia de la proteína spr en la presente invención incluye la secuencia señal. Por consiguiente, el aminoácido 1 de la proteína spr es el primer aminoácido (Met) que se muestra en SEQ ID NO: 21.

El gen spr mutado es el gen spr cromosómico de la célula.

El gen spr mutado codifica una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende adicionalmente un gen Tsp mutado. Las células que portan un gen Tsp mutado pueden tener una buena tasa de crecimiento celular, pero una limitación de estas células es su tendencia a la lisis, especialmente a altas densidades celulares. Por consiguiente, el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado es una tendencia a la lisis, especialmente a altas densidades celulares. Las células que portan un gen Tsp mutado también muestran un crecimiento termosensible a baja osmolaridad. Sin embargo, las mutaciones spr portadas por las células de la presente invención, cuando se introducen en una célula que tiene actividad reducida de Tsp, suprimen el fenotipo de Tsp reducido y, por lo tanto, la célula presenta una lisis reducida, particularmente a una densidad celular alta. El fenotipo de crecimiento de una célula puede ser medido fácilmente por un experto en la técnica durante un procedimiento en matraz de agitación o de fermentación de alta densidad celular. La supresión del fenotipo de lisis celular se puede observar a partir de la tasa de crecimiento mejorada y/o la producción de proteína recombinante, particularmente en el periplasma, exhibida por una célula que porta un mutante de spr y que tiene una actividad Tsp reducida en comparación con una célula que porta el mutante de Tsp y spr de tipo salvaje.

Las células de acuerdo con la presente invención comprenden un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147 y H157, preferiblemente una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 y H157. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene otras mutaciones.

La mutación de uno o más de los aminoácidos anteriores puede ser cualquier mutación de cambio de sentido adecuada en uno, dos o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido. La mutación cambia el residuo de aminoácido por cualquier aminoácido adecuado que da como resultado una proteína spr mutada capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. La mutación de cambio de sentido puede cambiar el aminoácido por uno que es de un tamaño diferente y/o tiene propiedades químicas diferentes en comparación con el aminoácido de tipo salvaje.

En una realización, el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una o más mutaciones seleccionadas entre C94A, S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D o G, H145A, G147C y H157A.

En una realización, la mutación es en uno, dos o tres de la tríada catalítica de residuos de aminoácido de C94, H145 y H157 (Solution NMR Structure of the NlpC/P60 Domain of Lipoprotein Spr from *Escherichia coli* Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad, *Biochemistry*, 2008, 47, 9715-9717).

Por consiguiente, el gen spr mutado puede comprender: una mutación en C94; o una mutación en H145; o una mutación en H157; o una mutación en C94 y H145; o una mutación en C94 y H157; o una mutación en H145 y H157; o una mutación en C94, H145 y H157.

En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene otras mutaciones.

Uno, dos o tres de C94, H145 y H157 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno, dos o tres de C94, H145 y H157 se pueden mutar a un pequeño aminoácido tal como Gly o Ala. Por consiguiente, la proteína spr puede tener una, dos o tres de las mutaciones C94A, H145A y H157A. En una realización, el gen spr comprende la mutación de cambio de sentido C94A, que se ha encontrado que produce una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. En otra realización, el gen spr comprende la mutación de cambio de sentido H145A, que se ha encontrado que produce una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

La designación de un mutante de sustitución en la presente memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína de tipo salvaje. El número se refiere a la posición del aminoácido donde se realiza la sustitución del aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se utiliza para reemplazar el aminoácido de tipo salvaje.

En una realización, la proteína spr mutante comprende una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147, preferiblemente una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene otras mutaciones. Por consiguiente, el gen spr mutado puede comprender: una mutación en N31; o una mutación en R62; o una mutación en 170; o una mutación en Q73; o una mutación en S95; o una mutación en V98; o una mutación en Q99; o una mutación en R100; o una mutación

en L108; o una mutación en Y115; o una mutación en D133; o una mutación en V135; o una mutación en L136; o una mutación en G140; o una mutación en R144; o una mutación en G147.

En una realización, la proteína spr mutante comprende múltiples mutaciones en los aminoácidos: S95 e Y115; o N31, Q73, R100 y G140; o Q73, R100 y G140; o R100 y G140; o Q73 y G140; o Q73 y R100; o R62, Q99 y R144; o Q99 y R144.

Uno o más de los aminoácidos N31, R62, 170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno o más de N31, R62, 170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140 y R144 se pueden mutar a un aminoácido pequeño tal como Gly o Ala.

En una realización, la proteína spr comprende una o más de las siguientes mutaciones: N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C. En una realización, la proteína spr comprende una o más de las siguientes mutaciones: S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D o V135G y G147C. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene otras mutaciones.

En una realización, la proteína spr tiene una mutación seleccionada entre N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene otras mutaciones.

En una realización adicional, la proteína spr tiene múltiples mutaciones seleccionadas de: S95F e Y115F; N31Y, Q73R, R100G y G140C; Q73R, R100G y G140C; R100G y G140C; Q73R y G140C; Q73R y R100G; R62C, Q99P y R144C; o Q99P y R144C.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación C94A.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación V103E.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación D133A.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación V135D.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación V135A.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación H145A.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación G147C.

En una realización, el gen spr mutado codifica una proteína spr que tiene una mutación H157A.

En una realización, el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación seleccionada entre H145A, H157A y D133A.

En una realización de la presente invención, se pueden realizar cualquier mutación o mutaciones adecuadas en el gen spr que den como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Preferiblemente, la proteína spr puede tener una o más de las siguientes mutaciones: N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C, H145A, G147C, H157A y W174R. En una realización, la proteína spr no comprende la mutación W174R. Preferiblemente, el gen spr comprende una o más mutaciones comentadas anteriormente.

Las células según la presente invención tienen una actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje. La expresión "actividad reducida de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje" significa que la actividad de Tsp de la célula se reduce en comparación con la actividad de la Tsp de una célula de tipo salvaje. La célula puede ser modificada por cualquier medio adecuado para reducir la actividad de Tsp.

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

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

En una realización preferida, las células de acuerdo con la presente invención portan un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene actividad de proteasa reducida o un gen Tsp mutado desactivado.

Preferiblemente, el gen Tsp cromosómico está mutado.

Como se emplea 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 la penicilina 3 (PBP3) y las proteínas de la cola del fago. La secuencia del gen Tsp de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la proteína Tsp de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO: 2.

5 La referencia al gen Tsp mutado o al gen Tsp mutado que codifica Tsp, se refiere a un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene actividad proteasa reducida o un gen Tsp mutado desactivado, a menos que se indique lo contrario.

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

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

15 Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen Tsp para producir una proteína que tenga actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína Tsp expresada a partir de una bacteria gram negativa puede ser sometida a prueba fácilmente por un experto en la técnica mediante cualquier método adecuado en la técnica, tal como el método descrito por Keiler et al. (Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 270, Núm. 48, Edición de 1 de diciembre, pág. 28864-28868, 1995
20 Kenneth C. Keiler y Robert T. Sauer) en donde se sometió a prueba la actividad proteasa de Tsp.

Keiler et al (*supra*) han informado de 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*) informan sobre el hallazgo de que los genes Tsp mutados S430A, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A no tienen actividad proteasa detectable. Adicionalmente, se informa de que el gen Tsp mutado
25 S430C muestra aproximadamente 5-10% de actividad de tipo salvaje. Por consiguiente, la mutación Tsp para producir una proteína que tiene actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de cambio de sentido en uno o más de los residuos S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452. Preferiblemente, la mutación Tsp para producir una proteína que tiene actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de cambio sentido en uno, dos o los tres residuos del sitio activo S430, D441 y K455.

30 Por consiguiente, 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 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad proteasa reducida. Los ejemplos de mutaciones adecuadas son
35 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 del sitio activo, por ejemplo, el gen puede comprender: S430A o S430C; y/o D441A; y/o K455A o K455H o K455R.

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

40 La expresión "gen Tsp mutado desactivado" en el contexto de la presente invención significa que el gen comprende una o más mutaciones que evitan la expresión de la proteína Tsp codificada por el gen de tipo salvaje para proporcionar una célula deficiente en la proteína Tsp. El gen desactivado se puede transcribir parcial o completamente, pero no se traduce a la proteína codificada. El gen Tsp mutado desactivado puede ser mutado de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por una o más mutaciones por delección, inserción, puntuales, de cambio de sentido, sin sentido y por desplazamiento de marco, para causar la no expresión de la proteína. Por ejemplo, el
45 gen puede desactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN foránea, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificante del gen.

En una realización preferida, el gen Tsp no se muta mediante la inserción de una secuencia de ADN foránea, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificante del gen. En esta realización, el gen Tsp puede comprender una mutación en el codón de inicio del gen y/o uno o más codones de parada situados aguas
50 abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen evitando así la expresión de la proteína Tsp. La mutación del codón de inicio puede ser una mutación de cambio de sentido de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de inicio. De forma alternativa o adicional, el codón de inicio se puede mutar por una mutación de desplazamiento de marco de inserción o de supresión. El gen Tsp comprende dos codones ATG en el extremo 5' de la secuencia codificante, uno o ambos codones ATG se pueden mutar mediante una mutación sin sentido. El gen
55 Tsp se puede mutar en el segundo codón ATG (codón 3) a TCG. El gen Tsp puede comprender alternativamente o adicionalmente uno o más codones de parada situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen. Preferiblemente, el gen Tsp mutado desactivado comprende tanto una mutación de cambio de sentido en el codón de inicio como uno o más codones de parada insertados. En una realización

preferida, el gen Tsp se muta para eliminar "T" del quinto codón, lo que provoca un desplazamiento de marco que da como resultado codones de parada en los codones 11 y 16. En una realización preferida, el gen Tsp se muta para insertar un sitio de restricción Ase I para crear un tercer codón de parada en marco en el codón 21.

5 En una realización preferida, el gen Tsp mutado desactivado tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3, que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codón de inicio. En una realización, el gen Tsp mutado tiene la secuencia de ADN de los nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO: 3.

En la presente invención, las células también portan uno o más genes capaces de expresar o expresar en exceso una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas. Los ejemplos incluyen proteínas tales como FkpA, Skp, SurA, PPIA y PPIB.

10 En una realización, la proteína para facilitar el plegamiento de proteínas es FkpA, Skp o una combinación de las mismas.

En una realización, la proteína para facilitar el plegamiento de proteínas se selecciona entre FkpA o una combinación de FkpA y Skp.

FkpA es una peptidil-prolil-cis-trans isomerasa con el número Swiss-Prot P45523.

15 Skp es una proteína chaperona con el número Swiss-Prot P0AEU7.

La proteína para facilitar el plegamiento de proteínas puede estar codificada por un gen en el genoma de las células o transfectarse de forma transitoria allí, por ejemplo, en un plásmido o una combinación de los mismos, según corresponda.

20 La célula bacteriana gram negativa recombinante de la invención no comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

25 En una realización de la presente invención, la célula bacteriana gram negativa recombinante comprende adicionalmente un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida y/o un gen ptr mutado, en donde el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado desactivado y/o un gen OmpT mutado, en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT que tiene actividad proteasa reducida o es un gen OmpT mutado desactivado.

En esta realización, el genoma de la célula es isogénico con respecto a una célula bacteriana de tipo salvaje, excepto por las mutaciones anteriores.

30 Como se emplea en la presente memoria, "DegP" significa un gen que codifica la proteína DegP (también conocida como HtrA), que tiene una doble función 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 SEQ ID NO: 7 y la secuencia de la proteína DegP no mutada se muestra en SEQ ID NO: 8.

35 A bajas temperaturas, DegP funciona como una chaperona y a altas temperaturas DegP tiene una preferencia por funcionar como una proteasa (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell*, Volumen 97, Tema 3, Páginas 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) y The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures, Skorko-Glonek J et al *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658).

En las realizaciones en las que la célula comprende la mutación DegP, la mutación DegP en la célula proporciona un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no actividad de proteasa completa.

40 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 salvaje. Preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más o 95% o más de la actividad chaperona de una proteína DegP no mutada de tipo salvaje. Más preferiblemente, el gen DegP mutado codifica una proteína DegP que tiene la misma actividad chaperona en comparación con la DegP de tipo salvaje.

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

Se puede introducir 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 gram negativa puede ser sometida a prueba fácilmente por un experto en la técnica mediante cualquier método adecuado, tal como el método descrito por Spiess et al., en donde las actividades proteasa y chaperona de DegP se sometieron a prueba en MaS, un sustrato natural de DegP (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Volumen 97, Tema 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 temperatures, Skorko-Glonek J et al Microbiology 2008, 154, 3649-3658.

DegP es una serina proteasa y tiene un centro activo que consiste en una tríada catalítica de residuos de aminoácido de His105, Asp135 y Ser210 (Families of serine peptidases, Methods Enzymol., 1994, 244:19-61 Rawlings N and Barrett A). La mutación DegP para producir una proteína que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, tal como una mutación de cambio de sentido en uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210.

Por consiguiente, el gen DegP mutado puede comprender: una mutación en His105; 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 His105, Asp135 y Ser210 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad chaperona y actividad proteasa reducida. Por ejemplo, uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 se puede mutar a un pequeño aminoácido tal como Gly o Ala. Otra mutación adecuada es cambiar uno, dos o tres de His105, Asp135 y Ser210 a un aminoácido con propiedades opuestas, tal como Asp135 que se muta a Lys o Arg, siendo mutado His105 polar a un aminoácido no polar, tal como Gly, Ala, Val o Leu y siendo mutado 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 11c, que se ha encontrado que produce una proteína que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa (Un cambio dependiente de la temperatura de chaperona a proteasa en una proteína de choque térmico muy conservada. Cell, Volumen 97, Tema 3, Páginas 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

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, Tema 3, Páginas 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M). En una realización de la presente invención, el gen degP se muta para suprimir el dominio PDZ1 y/o el dominio PDZ2. La delección de PDZ1 y PDZ2 da como resultado una pérdida completa de la actividad proteasa de la proteína DegP y una actividad chaperona reducida en comparación con la proteína DegP de tipo salvaje, mientras que la eliminación de PDZ1 o PDZ2 da como resultado una actividad proteasa de 5% y una actividad chaperona similar en comparación con la proteína DegP (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Volumen 97, Tema 3, Páginas 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

El gen DegP mutado también puede comprender un sitio de restricción silencioso de origen no natural, tal como Ase I para ayudar a la identificación y a los métodos de escrutinio, por ejemplo, como se muestra en la Figura 7C.

La secuencia preferida del gen DegP mutado que comprende la mutación puntual S210A y un sitio marcador de restricción Ase I se proporciona en SEQ ID NO: 9 y la secuencia de la proteína codificada se muestra en SEQ ID NO: 10.

En las realizaciones de la presente invención en las que la célula comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, una o más de las células proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un rendimiento mejorado de proteínas plegadas correctamente a partir de la célula con respecto a células mutadas en donde el gen DegP ha sido mutado a DegP desactivado evitando la expresión de DegP, tal como DegP deficiente cromosómica. En una célula que comprende un gen DegP mutado desactivado que previene la expresión de DegP, la actividad chaperona de DegP se pierde completamente mientras que en la célula de acuerdo con la presente invención la actividad chaperona de DegP se conserva mientras se pierde la actividad proteasa completa. En estas realizaciones, una o más células de acuerdo con la presente invención tienen una actividad proteasa inferior para prevenir la proteólisis de la proteína mientras se mantiene la actividad chaperona para permitir el correcto plegamiento y transporte de la proteína en la célula anfitriona.

En estas realizaciones, una o más células según la presente invención pueden tener un crecimiento celular mejorado en comparación con las células que portan un gen DegP desactivado mutado que previene la expresión de DegP. Sin desear estar limitado por la teoría, se puede mostrar crecimiento celular mejorado debido a que la proteasa DegP retiene la actividad chaperona, lo que puede aumentar la capacidad de la célula para procesar todas las proteínas que requieren actividad chaperona. Por consiguiente, la producción de proteínas correctamente plegadas necesarias para el crecimiento y la reproducción de la célula pueden aumentar en una o más de las células de la presente invención en comparación con las células que tienen una mutación desactivada de DegP, mejorando así las vías celulares que regulan el crecimiento. Adicionalmente, las cepas conocidas con deficiencia de proteasa DegP son generalmente sensibles a la temperatura y no crecen típicamente a temperaturas superiores a aproximadamente

28°C. Sin embargo, las células de acuerdo con la presente invención no son sensibles a la temperatura y pueden crecer a temperaturas de 28°C o más, incluyendo temperaturas de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C, que se utilizan típicamente para la producción a escala industrial de proteínas a partir de bacterias.

5 En una realización de la presente invención, la célula porta un gen ptr mutado. Como se emplea en la presente memoria, "gen ptr" significa un gen que codifica la Proteasa III, una proteasa que degrada proteínas de alto peso molecular. La secuencia del gen ptr no mutado se muestra en SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la proteína Proteasa III no mutada se muestra en SEQ ID NO: 5.

10 La referencia al gen ptr mutado o al gen ptr mutado que codifica la Proteasa III, se refiere a un gen ptr mutado que codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida o un gen ptr mutado desactivado, a menos que se indique lo contrario.

La expresión "gen ptr mutado que codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida" en el contexto de la presente invención significa que el gen ptr mutado no tiene la actividad proteasa completa en comparación con el gen ptr no mutado de tipo salvaje.

15 Preferiblemente, el gen ptr mutado codifica una Proteasa III que tiene 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos o 5% o menos de la actividad proteasa de una proteína Proteasa III no mutada de tipo salvaje. Más preferiblemente, el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que no tiene actividad proteasa. En esta realización, la célula no es deficiente en ptr cromosómica, es decir, la secuencia del gen ptr no se ha suprimido ni mutado para evitar la expresión de cualquier forma de proteína Proteasa III.

20 Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen ptr para producir una proteína Proteasa III que tenga actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína Proteasa III expresada a partir de una bacteria gram negativa puede ser probada fácilmente por un experto en la técnica por medio de cualquier método adecuado en la técnica.

25 La expresión "gen ptr mutado desactivado" en el contexto de la presente invención significa que el gen comprende una o más mutaciones, no causando de ese modo expresión de la proteína codificada por el gen para proporcionar una célula deficiente en la proteína codificada por el gen mutado desactivado. El gen desactivado se puede transcribir parcial o completamente, pero no se traduce a la proteína codificada. El gen ptr mutado desactivado puede ser mutado de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante una o más mutaciones de delección, inserción, puntuales, de cambio de sentido, sin sentido y por desplazamiento de marco, para causar la no expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen puede desactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN foránea, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificante del gen.

30 En una realización preferida, el gen no se muta mediante la inserción de una secuencia de ADN foránea, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificante del gen. Preferiblemente, el gen de la Proteasa III comprende una mutación en el codón de inicio y/o uno o más codones de parada del gen situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen, evitando así la expresión de la proteína Proteasa III.

35 Una mutación en el codón de inicio del gen desactivado diana provoca la pérdida de la función del codón de inicio y, por lo tanto, garantiza que el gen diana no comprenda un codón de inicio adecuado al comienzo de la secuencia codificante. La mutación del codón de inicio puede ser una mutación de cambio de sentido de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de inicio. De forma alternativa o adicional, el codón de inicio se puede mutar mediante una mutación de desplazamiento de marco de inserción o de delección.

En una realización preferida, el gen ptr se muta para cambiar el codón de inicio ATG a ATT.

40 El gen ptr mutado desactivado puede comprender alternativamente o adicionalmente uno o más codones de parada situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen. Preferiblemente, el gen ptr mutado desactivado comprende tanto una mutación de cambio de sentido en el codón de inicio como uno o más codones de parada insertados.

45 Los uno o más codones de parada insertados son preferiblemente codones de parada en marco. Sin embargo, los uno o más codones de parada insertados pueden ser alternativamente o adicionalmente codones de parada fuera de marco. Es posible que se requieran uno o más codones de parada fuera de marco para detener la traducción cuando un codón de inicio fuera de marco se cambia por un codón de inicio en marco mediante una mutación de desplazamiento de marco de inserción o de delección. Los uno o más codones de parada se pueden introducir mediante cualquier mutación adecuada incluyendo una mutación puntual sin sentido y una mutación de desplazamiento de marco. Los uno o más codones de parada se introducen preferiblemente mediante una mutación de desplazamiento de marco y/o una mutación de inserción, preferiblemente mediante la sustitución de un segmento de la secuencia del gen por una secuencia que comprende un codón de parada. Por ejemplo se puede insertar un sitio de restricción Ase I, que comprende el codón de parada TAA.

55 En una realización preferida, el gen ptr se muta para insertar un codón de parada en marco mediante la inserción de

un sitio de restricción Ase I, como se muestra en la Figura 7A. En una realización preferida, el gen ptr mutado desactivado tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6.

Las mutaciones desactivadas descritas anteriormente son ventajosas porque causan una interrupción mínima o nula en el ADN cromosómico aguas arriba o aguas abajo del sitio del gen desactivado diana y no requieren la inserción y retención de ADN foráneo, tales como marcadores de resistencia a antibióticos, que pueden afectar a la idoneidad de la célula para expresar una proteína de interés, particularmente proteínas terapéuticas. Por consiguiente, una o más de las células de acuerdo con la presente invención pueden exhibir características de crecimiento y/o expresión de proteínas mejoradas en comparación con las células en las que el gen de la proteasa se ha desactivado mediante inserción de ADN foráneo en la secuencia codificante del gen.

En una realización, las células según la presente invención portan un gen OmpT mutado. Como se emplea en la presente memoria, "gen OmpT" significa un gen que codifica la proteasa OmpT (proteasa T de la membrana externa) que es una proteasa de la membrana externa. La secuencia del gen OmpT no mutado de tipo salvaje es SWISS-PROT P09169.

La referencia a un gen OmpT mutado o un gen OmpT mutado que codifica OmpT, se refiere a un gen OmpT mutado que codifica una proteína OmpT que tiene actividad proteasa reducida o un gen OmpT mutado desactivado, a menos que se indique lo contrario.

La expresión "gen OmpT mutado que codifica una proteína OmpT que tiene actividad proteasa reducida" en el contexto de la presente invención significa que el gen OmpT mutado no tiene la actividad proteasa completa en comparación con el gen OmpT no mutado de tipo salvaje. El gen OmpT mutado puede codificar una proteína OmpT que tenga 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos o 5% o menos de la actividad de proteasa de una proteína OmpT no mutada de tipo salvaje. El gen OmpT mutado puede codificar una proteína OmpT que no tiene actividad proteasa. En esta realización, la célula no es deficiente en OmpT cromosómico, es decir, la secuencia del gen OmpT no se ha suprimido ni mutado para evitar la expresión de cualquier forma de proteína OmpT.

Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen OmpT para producir una proteína que tenga actividad proteasa reducida. La actividad de proteasa de una proteína OmpT expresada a partir de una bacteria gram negativa puede ser sometida a prueba fácilmente por un experto en la técnica mediante cualquier método adecuado en la técnica, tal como el método descrito por Kramer et al. (Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site, FEBS Letters 505 (2001) 426-430) y Dekker et al. (Substrate Specificity of the Integral Membrane Protease OmpT Determined by Spatially Addressed Peptide Libraries, Biochemistry 2001, 40, 1694-1701).

OmpT ha sido referida por Kramer et al. (Identification of active site serine and histidine residues in Escherichia coli outer membrane protease OmpT FEBS Letters 2000 468, 220-224) que describe que la sustitución de serinas, histidinas y residuos ácidos por alaninas da como resultado una actividad reducida ~10 veces para Glu27, Asp97, Asp208 o His101, actividad reducida ~500 veces para Ser99 y actividad reducida de ~10000 para Asp83, Asp85, Asp210 o His212. Vandeputte-Rutten et al. (Crystal Structure of the Outer Membrane Protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site, The EMBO Journal 2001, Vol 20 Núm 18 5033-5039) por tener un sitio activo que comprende un par Asp83-Asp85 y un par His212-Asp210. Adicionalmente Kramer et al. (Lipopolysaccharide regions involved in the activation of Escherichia coli outer membrane protease OmpT, Eur. J. Biochem. FEBS 2002, 269, 1746-1752) describe que las mutaciones D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K/K217G, K217T y R218L en el bucle L4 dan como resultado una pérdida parcial o prácticamente completa de la actividad enzimática.

Por consiguiente, la mutación OmpT para producir una proteína que tiene actividad proteasa reducida puede comprender una mutación, como una mutación de cambio de sentido en uno o más de los residuos E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 y E250.

Uno o más de E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212, G216, K217, R218 y E250 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad proteasa reducida. Por ejemplo, uno o más de E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212, G216, K217, R218 y E250 se pueden mutar a alanina. Los ejemplos de mutaciones adecuadas son E27A, D43A, D83A, D85A, D97A, S99A, H101A, E111A, E136A, E193A, D206A, D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K, K217G, K217T, R218L y E250A. En una realización, el gen OmpT mutado comprende mutaciones D210A y H212A. Una secuencia de OmpT mutada adecuada que comprende mutaciones D210A y H212A se muestra en SEQ ID NO: 23.

La expresión "gen OmpT mutado desactivado" en el contexto de la presente invención significa que el gen comprende una o más mutaciones que no causan expresión de la proteína codificada por el gen para proporcionar una célula deficiente en la proteína codificada por el gen mutado desactivado. El gen desactivado se puede transcribir parcial o completamente, pero no se traduce a la proteína codificada. El gen OmpT mutado desactivado se puede mutar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante una o más mutaciones por delección,

inserción, puntuales, de cambio de sentido, sin sentido y de desplazamiento de marco, para causar la no expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen se puede desactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN foránea, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia codificante del gen.

5 En una realización, el gen OmpT comprende una mutación en el codón de inicio y/o uno o más codones de parada del gen situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen, evitando así la expresión de la proteína OmpT. La mutación del codón de inicio puede ser una mutación de cambio de sentido de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de inicio. Una secuencia de OmpT desactivada mutada adecuada se muestra en SEQ ID NO: 24. Alternativamente, o adicionalmente, el codón de inicio se puede mutar mediante una mutación de desplazamiento de marco de inserción o de delección.

10 En una realización, la célula bacteriana gram negativa según la presente invención no porta un gen ompT mutado desactivado, por ejemplo que es deficiente en ompT cromosómico.

En una realización, la célula bacteriana gram negativa según la presente invención no porta un gen degP mutado desactivado, por ejemplo que es deficiente en degP cromosómica. En una realización, la célula bacteriana gram negativa según la presente invención no porta un gen degP mutado.

15 En una realización, la célula bacteriana gram negativa según la presente invención no porta un gen ptr mutado desactivado, por ejemplo que es deficiente en ptr cromosómico.

20 Muchas mutaciones realizadas mediante ingeniería genética, incluyendo las mutaciones desactivadas, implican el uso de marcadores de resistencia a antibióticos que permiten la selección e identificación de células mutadas satisfactoriamente. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen varios inconvenientes en el uso de marcadores de resistencia a antibióticos.

25 En una realización adicional de la presente invención, la célula no comprende un marcador de resistencia a antibióticos y supera las desventajas anteriores de utilizar marcadores de resistencia a antibióticos en donde el gen Tsp mutado, el gen spr mutado y opcionalmente el gen DegP mutado y/o un gen ptr mutado y/o un gen OmpT mutado, se mutan para que comprendan uno o más sitios para marcadores de restricción. Los sitios de restricción están modificados genéticamente en el gen y son de origen no natural. Los sitios para marcadores de restricción son ventajosos porque permiten el escrutinio y la identificación de células correctamente modificadas que comprenden las mutaciones cromosómicas requeridas. Las células que se han modificado para que porten uno o más de los genes de proteasa mutados se pueden analizar mediante PCR de ADN genómico de productos lisados celulares utilizando pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar una región del ADN genómico que comprende un sitio para un marcador de restricción de origen no natural. El ADN amplificado se puede analizar a continuación mediante electroforesis en gel de agarosa antes y después de la incubación con una enzima de restricción adecuada capaz de digerir el ADN en el sitio para el marcador de restricción de origen no natural. La presencia de fragmentos de ADN después de la incubación con la enzima de restricción confirma que las células se han modificado con éxito para que porten los uno o más genes mutados.

35 En la realización en donde la célula porta un gen ptr mutado desactivado que tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6, las secuencias de cebadores oligonucleotídicos mostradas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 se pueden utilizar para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural del ADN genómico de células transformadas. El ADN genómico amplificado se puede incubar a continuación con la enzima de restricción Ase I y analizar mediante electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen ptr mutado en el ADN genómico.

45 En la realización en donde la célula comprende un gen Tsp mutado desactivado que tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3 o los nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO: 3, las secuencias del cebador oligonucleotídico mostradas en SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 se puede utilizar para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural del ADN genómico de las células transformadas. El ADN genómico amplificado se puede incubar a continuación con la enzima de restricción Ase I y analizar mediante electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen Tsp mutado en el ADN genómico.

50 En la realización en donde la célula comprende un gen DegP mutado que tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 9, las secuencias de cebadores oligonucleotídicos mostradas en SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 se pueden utilizar para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción Ase I de origen no natural del ADN genómico de las células transformadas. El ADN genómico amplificado se puede incubar a continuación con la enzima de restricción Ase I y analizar mediante electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen DegP mutado en el ADN genómico.

55 Los uno o más sitios de restricción se pueden introducir mediante cualquier mutación adecuada, incluyendo una o más mutaciones por delección, inserción, puntuales, de cambio de sentido, sin sentido y de desplazamiento de marco. Se puede introducir un sitio de restricción mediante la mutación del codón de inicio y/o la mutación para introducir los uno o más codones de parada, como se describió anteriormente. Esta realización es ventajosa puesto que el sitio para el marcador de restricción es un marcador directo y único de las mutaciones desactivadas introducidas.

Se puede insertar un sitio para un marcador de restricción que comprende un codón de parada en marco, tal como un sitio de restricción *Ase I*. Esto es particularmente ventajoso puesto que el sitio de restricción insertado sirve como un sitio para un marcador de restricción y un codón de parada para prevenir la transcripción completa de la secuencia codificante del gen. Por ejemplo, en la realización en donde se introduce un codón de parada en el gen *ptr* mediante la introducción de un sitio *Ase I*, esto también crea un sitio de restricción, como se muestra en la Figura 7A. Por ejemplo, en la realización en donde se introduce un codón de parada en el gen *Tsp* en el codón 21 mediante la introducción de un sitio *Ase I*, esto también crea un sitio de restricción, como se muestra en la Figura 7B.

Se puede insertar un sitio para un marcador de restricción mediante la mutación en el codón de inicio y, opcionalmente, una o más mutaciones puntuales adicionales. En esta realización, el sitio para el marcador de restricción es preferiblemente un sitio de restricción *EcoR I*. Esto es particularmente ventajoso puesto que la mutación al codón de inicio también crea un sitio para un marcador de restricción. Por ejemplo, en la realización en donde el codón de inicio del gen *ptr* se cambia a ATT, esto crea un sitio para el marcador *EcoR I*, como se muestra en la Figura 11a. Por ejemplo, en la realización en donde el codón de inicio (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 AAT y la mutación del codón 3 ATG a TCG crea un sitio para el marcador de restricción *EcoR I*, como se muestra en la Figura 7B.

En la realización de la presente invención en donde la célula porta un gen *OmpT* mutado, los uno o más sitios de restricción se pueden introducir mediante cualquier mutación adecuada incluyendo mediante una o más mutaciones por delección, inserción, puntuales, de cambio de sentido, sin sentido y por desplazamiento de marco. Por ejemplo, en la realización en donde el gen *OmpT* comprende las mutaciones D210A y H212A, estas mutaciones introducen el sitio de restricción *HindIII* silencioso que se puede utilizar como un marcador de selección.

En el gen *DegP* o el gen *spr*, se puede introducir un sitio de restricción para el marcador utilizando cambios de codón silenciosos. Por ejemplo, se puede utilizar un sitio *Ase I* como sitio para marcador de restricción silencioso, en donde el codón de parada de TAA está fuera del marco, como se muestra en la Figura 7C para el gen *DegP* mutado.

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

La célula bacteriana gram negativa recombinante de acuerdo con la presente invención se puede producir por cualquier medio adecuado. El experto en la técnica conoce mecanismos adecuados que se pueden utilizar para reemplazar una secuencia de un gen cromosómico por una secuencia de un gen mutado. Se pueden emplear vectores adecuados que permitan la integración en el cromosoma anfitrión mediante recombinación homóloga.

Los métodos de sustitución de genes adecuados son descritos, por ejemplo, por Hamilton C. M. *et al.*, (New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in *Escherichia coli*, Hamilton C. M. *et al.*, *Journal of Bacteriology* sept. 1989, Vol. 171, Núm. 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). A suitable plasmid which enables homologous recombination/replacement is the pKO3 plasmid (Link *et al.*, 1997, *Journal of Bacteriology*, 179, 6228-6237).

Las cepas mutadas satisfactoriamente se pueden identificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la secuenciación de ADN de PCR de colonias y el mapeo de enzimas de restricción de PCR de colonias.

En la realización en donde la célula comprende dos o más genes cromosómicos mutados, los genes mutados pueden introducirse en la bacteria gram negativa en el mismo vector o en diferentes vectores.

En una realización, la célula bacteriana gram negativa según la presente invención no porta un gen *ompT* mutado desactivado, por ejemplo que es deficiente en *ompT* cromosómico.

En una realización, las células de acuerdo con la presente descripción solo contienen las tres mutaciones de caracterización de *spr* mutado, *Tsp* reducido y expresan *FkpA*, *Skp* o una combinación de *FkpA* y *Skp*.

En una realización, la línea celular según la presente descripción consiste en un gen *Tsp* mutado y un gen *spr* mutado, y un gen *FkpA*.

En una realización, la línea celular según la presente descripción consiste en un gen *Tsp* mutado y un gen *spr* mutado, y un gen *Skp*.

En una realización, la línea celular según la presente descripción consiste en un gen *Tsp* mutado y un gen *spr* mutado, un gen *FkpA* y un gen *Skp*.

En una realización, el gen o los genes capaces de expresar o expresar en exceso una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como FkpA y Skp, se transforman transitoriamente en la célula, por ejemplo, en un vector de expresión que comprende opcionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

5 En una realización, la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo y el polinucleótido que codifica FkpA y/o Skp se insertan en vectores de expresión separados.

Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede transformarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

10 Alternativamente, la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo y el polinucleótido que codifica FkpA y/o Skp se insertan en un vector. Preferiblemente, el vector comprende las secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y pesada del anticuerpo.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que codifica FkpA y/o Skp y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para FcRn humano. El vector de expresión es un vector multicistrónico que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica FkpA y/o Skp y la secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo.

El vector multicistrónico se puede producir mediante un método de clonación ventajoso que permite la clonación secuencial repetida de secuencias de polinucleótidos en un vector. El método utiliza extremos cohesivos compatibles de un par de sitios de restricción, tales como los extremos "AT" de los sitios de restricción *Ase I* y *Nde I*. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia codificante y que tiene extremos cohesivos compatibles, tal como un fragmento *AseI-NdeI*, se puede clonar en un sitio de restricción en el vector, tal como *Nde I*. La inserción de la secuencia de polinucleótidos destruye el sitio de restricción 5' pero crea un nuevo sitio de restricción 3', tal como *NdeI*, que a continuación se puede utilizar para insertar una secuencia de polinucleótidos adicional que comprende extremos cohesivos compatibles. Después se puede repetir el procedimiento para insertar secuencias adicionales. Cada secuencia de polinucleótido insertada en el vector comprende una secuencia no codificante 3' con respecto al codón de parada que puede comprender un sitio *Ssp I* para su escrutinio, una secuencia de unión a ribosoma de Shine Dalgarno, un espaciador rico en A y un sitio *NdeI* que codifica un codón de inicio.

En la Figura 7d se muestra una representación esquemática de la creación de un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera de un anticuerpo (LC), una cadena pesada de un anticuerpo (HC), una secuencia polinucleotídica FkpA y una secuencia polinucleotídica adicional.

La célula de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente un vector de expresión como se define anteriormente.

Adicionalmente, en la presente memoria se describe un ejemplo en el que la célula también expresa una o más proteínas adicionales como sigue: una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas, tales como, skp, SurA, PPIA y PPIID; y opcionalmente una o más proteínas capaces de facilitar la secreción o translocación de proteínas, tales como SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY y Lep; las una o más proteínas adicionales se pueden expresar a partir de uno o más polinucleótidos insertados en el mismo vector que el polinucleótido que codifica FkpA y/o la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo. Alternativamente, los uno o más polinucleótidos se pueden insertar en vectores separados.

El vector de expresión se puede producir insertando uno o más casetes de expresión como se definió anteriormente en un vector adecuado. Alternativamente, las secuencias de expresión reguladoras para dirigir la expresión de la secuencia polinucleotídica pueden estar contenidas en el vector de expresión y, por lo tanto, se puede requerirse solamente la región codificante del polinucleótido para completar el vector de expresión.

45 El polinucleótido que codifica FkpA y/o Skp y/o el polinucleótido que codifica el anticuerpo se insertan adecuadamente en un vector replicable, típicamente un vector de expresión de replicación autónoma, para la expresión en la célula bajo el control de un promotor adecuado para la célula. Se conocen muchos vectores en la técnica para este propósito y la selección del vector apropiado puede depender del tamaño del ácido nucleico y particularmente del tipo de célula.

50 Los ejemplos de vectores de expresión que se pueden emplear para transformar la célula anfitriona con un polinucleótido de acuerdo con la invención incluyen:

- un plásmido, tal como pBR322 o pACYC184, y/o
- un vector viral tal como el fago bacteriano
- un elemento genético transponible tal como un transposón

Tales vectores de expresión generalmente comprenden un origen plasmídico de la replicación del ADN, un marcador seleccionable para antibióticos, un promotor y un terminador transcripcional separados por un sitio de clonación múltiple (casete de expresión) y una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión al ribosoma.

5 Los promotores empleados en la presente invención se pueden conectar al polinucleótido relevante de forma directa o alternativamente, se pueden ubicarse en una posición apropiada, por ejemplo en un vector, de manera que cuando se inserte el polipéptido relevante, el promotor relevante pueda actuar sobre el mismo. En una realización, el promotor está situado antes de la porción codificante del polinucleótido sobre el que actúa, por ejemplo, un promotor relevante antes de cada porción codificante de polinucleótido. Se pretende que "antes", como se emplea en la presente memoria, implique que el promotor está ubicado en el extremo 5 prima con respecto a la porción de polinucleótido codificante.

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

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

20 Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) conectada operativamente al ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor se puede eliminar del ADN de la fuente bacteriana mediante digestión con enzimas de restricción e insertar en el vector que contiene el ADN deseado.

25 El vector de expresión también comprende preferiblemente un mensaje dicistrónico para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en los documentos WO03/048208 o WO2007/039714 (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia). Preferiblemente, el cistrón aguas arriba contiene el ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón aguas abajo contiene el ADN que codifica la cadena pesada correspondiente, y la secuencia intergénica dicistrónica (IGS) comprende preferiblemente una secuencia seleccionada entre IGS1 (SEQ ID NO: 23), IGS2 (SEC ID NO: 24), IGS3 (SEC ID NO: 25) e IGS4 (SEC ID NO: 26).

30 Los terminadores pueden ser endógenos o exógenos con respecto a las células anfitrionas. Un terminador adecuado es rrmB.

Otros reguladores transcripcionales adecuados que incluyen promotores y terminadores y métodos de direccionamiento de proteínas se pueden encontrar en "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli" Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, sept 1996, pág. 512-538.

35 El polinucleótido FkpA insertado en el vector de expresión comprende preferiblemente el ácido nucleico que codifica las secuencias señal de FkpA y la secuencia codificante de FkpA. El vector contiene preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector replique en una o más células anfitrionas seleccionadas, preferiblemente replique independientemente del cromosoma anfitrión. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias.

40 En una realización, FkpA y/o Skp y/o la proteína de interés comprenden una etiqueta de histidina en el extremo N y/o el extremo C.

La molécula de anticuerpo puede ser secretada de la célula o dirigida al periplasma mediante secuencias señal adecuadas. Alternativamente, las moléculas de anticuerpo se pueden acumularse dentro del citoplasma de la célula. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo está dirigida al periplasma.

45 El polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede expresarse como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada por la célula anfitriona. Para las células anfitrionas procarióticas que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativo o de un polipéptido eucariótico, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariótica. Las secuencias señal adecuadas incluyen OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA y DsbC. En una realización en donde la célula comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada de anticuerpo y una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera de anticuerpo, cada polinucleótido puede comprender una secuencia señal, tal como OmpA.

55 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de ligación convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Los métodos generales mediante

los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

5 Se pueden utilizar técnicas convencionales de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican el anticuerpo. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis dirigida y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

10 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, casetes de expresión y/o células anfitrionas que comprenden los componentes empleados en la misma, en la medida en que el aspecto relevante puede aplicarse a la misma.

15 La célula de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés puede ser exógena o endógena. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés puede integrarse en el cromosoma del anfitrión o puede no integrarse en un vector, típicamente un plásmido.

En una realización, la célula según la presente invención expresa una proteína de interés. Se pretende que "proteína de interés" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiera a un polipéptido para la expresión, generalmente un polipéptido recombinante. Sin embargo, la proteína de interés puede ser una proteína endógena expresada a partir de un gen endógeno en la célula anfitriona.

20 Como se emplea en la presente memoria, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o produce utilizando tecnología de ADN recombinante. La proteína de interés puede ser una secuencia exógena idéntica a una proteína endógena o una versión mutada de la misma, por ejemplo, con actividad biológica atenuada, o un fragmento de la misma, expresada a partir de un vector exógeno. Alternativamente, la proteína de interés puede ser una proteína heteróloga, normalmente no expresada por la célula anfitriona.

25 La proteína de interés puede ser cualquier proteína adecuada que incluya una proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstica.

El experto en la técnica podría someter prueba fácilmente la proteína secretada para ver si la proteína se pliega correctamente utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC con proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medición de afinidad de epítopos.

30 En una realización, la proteína de interés es útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen trastornos inmunológicos y/o enfermedades autoinmunitarias.

35 En una realización, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre la encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, vasculitis asociada a ANCA, espondilitis anquilosante y nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disfunción autonómica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad autoinmunitaria de la tiroides, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Baló, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celiaca, enfermedad de chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), ostiomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), Síndrome de Churg-Strauss, pemfigoide catricial/pemfigoide de la mucosa benigno, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogans, enfermedad de aglutinina fría, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis por virus coxsackie, enfermedad CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herperiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic, (neuromielitis óptica) cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fibrosis angiocéntrica eosinofílica, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Evans, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangiitis (GPA) véase Wegener, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, nefritis tubulointersticial hipocomplementaria idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedad relacionada con IgG4, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladoras, aneurisma aórtico inflamatorio, pseudotumor inflamatorio, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes insulino dependiente (tipo 1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, tumor de Kuttner, Síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad por IgA lineal (LAD), lupus (SLE), enfermedad de Lyme, fibrosis mediastínica crónica, enfermedad de Meniere, poliangiitis microscópica, síndrome de Mikulicz, enfermedad de tejido conectivo mixto (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, fibroesclerosis multifocal, esclerosis múltiple,

5 miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (de Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, enfermedad de Ormond (fibrosis retroperitoneal), reumatismo palindrómico (PANDAS), trastornos neuropsiquiátricos Autoinmunitarias Pediátricos asociados con estreptococos), degeneración cerebelar paraneoplásica, polineuropatías paraproteinémicas, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis (uveítis periférica), pénfigo vulgar, periaortitis, periarteritis, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarias de tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome de infarto post-miocardio, síndrome postpericardiotomía, dermatitis por progesterona, cirrosis biliar primaria, colangiitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenosa, aplasia pura de glóbulos rojos, fenómeno de Raynaud, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recurrente, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond), fiebre reumática, artritis reumatoide, tiroiditis de Riedel, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, autoinmunopatía testicular y contra espermatozoides, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa enfermedad del tejido conectivo no diferenciado (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculoampollar, vitíligo, macroglobulinemia de Waldenstrom, anemia hemolítica idiopática tipo caliente y granulomatosis de Wegener (ahora denominada Granulomatosis con Poliangiitis (GPA).

20 En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), síndrome de Guillain-Barré, polineuropatías paraproteinémicas, neuromielitis óptica (NMO, trastornos del espectro NMO o enfermedades del espectro NMO) y miastenia gravis.

En una realización, el trastorno hematológico inmunológico se selecciona entre púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica idiopática tipo caliente, el síndrome de Goodpasture y incompatibilidad de donante en trasplante debido a anticuerpos anti-HLA.

25 En una realización, la enfermedad se selecciona entre miastenia gravis, neuromielitis óptica, CIDP, síndrome de Guillaume-Barré, polineuropatía para-proteinémica, epilepsia refractaria, ITP/TTP, anemia hemolítica, síndrome de Goodpasture, incompatibilidad ABO, nefritis por Lupus, vasculitis renal, esclerodermia, alveolitis fibrosante, miocardiopatía dilatada, enfermedad de Grave, diabetes tipo 1, diabetes autoinmunitaria, pénfigo, esclerodermia, lupus, vasculitis ANCA, dermatomiositis, enfermedad de Sjogren y artritis reumatoide.

30 En una realización, el trastorno dermatológico se selecciona entre penfigoide ampollar, pénfigo vulgar, vasculitis asociada a ANCA y cardiomiopatía dilatada.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente descripción se pueden emplear en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades aloinmunitarias asociadas con el trasplante alogénico de órganos o tejidos o ciertas afecciones neonatales.

35 La proteína puede ser un polipéptido proteolíticamente sensible, es decir, proteínas que son propensas a ser escindidas, susceptibles de escindirse, o escindidas por una o más proteasas bacterianas gram negativas, tales como las de *E. coli*, ya sea en el estado nativo o durante la secreción. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a una proteasa seleccionada entre DegP, Proteasa III y Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a la proteasa Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP y Proteasa III. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP y Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas Tsp y Proteasa III. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP, Proteasa III y Tsp.

Preferiblemente, la proteína es un polipéptido eucariótico.

45 La proteína de interés expresada por las células de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, un inmunógeno, una proteína de fusión que comprende dos proteínas heterólogas o un anticuerpo. Los anticuerpos para uso como la proteína de interés incluyen anticuerpos monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados, totalmente humanos o quiméricos. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, pero preferiblemente se obtiene de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano o un fragmento humanizado. El anticuerpo se puede obtener de cualquier clase (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina y se puede obtener de cualquier especie, incluyendo por ejemplo ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama cabra o ser humano. Partes del fragmento de anticuerpo se pueden obtener de más de una especie, 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.

55 El anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras completas o un fragmento de las mismas, p. ej. fragmento VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv o un anticuerpo de doble especificidad, tal como un Fab-dAb o Fab-Fv, como se describe en los documentos WO2009/040562 y WO2010/035012.

En una realización, la proteína es un Fab'.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a células, por ejemplo, una proteína de la superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tal como aquellas proteínas reguladas al alza durante una enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos concretos de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adherencia, por ejemplo integrinas tales como integrinas $\beta 1$, p. ej. VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, 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, nectina tipo 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de clase I de MHC y clase II de MHC, KDR y VEGF, y en su caso, receptores de los mismos.

Los antígenos solubles incluyen interleuquinas 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 virales, por ejemplo, antígenos de virus sincitial respiratorio o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones, tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (antes denominado factor de necrosis tumoral α), factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como 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 la superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionúclidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En una realización, el antígeno es FcRn.

Los anticuerpos para uso en la presente descripción se pueden obtener utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido/proteína FcRn que incluye proteínas de fusión y sus mutantes, incluidas las células (de forma recombinante o natural) que expresan el polipéptido (tales como células T activadas) se puede utilizar para producir anticuerpos que reconozcan específicamente FcRn. El polipéptido puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento o derivado biológicamente activo del mismo. La proteína humana está registrada en Swiss-Prot con el número P55899. En una realización, el inmunógeno es la cadena alfa de FcRn o un fragmento de la misma.

Los polipéptidos, para su uso para inmunizar un anfitrión, se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células anfitrionas modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o se pueden recuperar de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se utilizan indistintamente a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido FcRn puede ser, en algunos casos, parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con una etiqueta de afinidad.

Los anticuerpos generados contra el polipéptido FcRn se pueden obtener, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, utilizando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más adecuados.

En una realización, el anticuerpo se puede utilizar para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar o ejercer un efecto antagónico o agonístico de la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente o simplemente bloquear la unión del ligando normal al mismo.

La presente invención también proporciona una célula bacteriana gram negativa recombinante que comprende un gen Tsp mutado, en donde el gen Tsp mutado codifica una proteína Tsp que tiene actividad proteasa reducida o es un gen Tsp mutado desactivado, un gen spr mutante que codifica una spr mutante, un gen capaz de expresar o expresar en exceso una o varias proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas y una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para FcRn.

Se muestran varios anticuerpos y fragmentos anti-FcRn en las secuencias 36 a 74.

En una realización, la cadena pesada comprende 1, 2 o 3 CDR seleccionadas independientemente entre SEQ ID NO: 36, 37 y 38.

En una realización, la cadena ligera comprende 1, 2 o 3 CDR seleccionadas independientemente entre SEQ ID NO: 39, 40 y 41.

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 36 para

CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 37 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 38 para CDRH3.

5 En una realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 39 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 41 para CDRL3.

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 36 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 37 para CDR-H2, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 38 para CDRH3, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 39 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 41 para CDRL3.

10 En una realización, la célula expresa una molécula de anticuerpo con una secuencia descrita en la presente memoria.

Las moléculas de anticuerpo incluyen anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos.

15 Adecuadamente, el anticuerpo humanizado según la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marcoceptoras humanas, así como una o más de las CDR proporcionadas específicamente en la presente memoria. Por lo tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo humanizado que se une a FcRn humano en donde los dominios variables comprenden regiones marcoceptoras humanas y CDR donadoras no humanas. En un ejemplo, el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 50 y el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 58. En un ejemplo, la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 62.

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

25 El término molécula efectora como se emplea en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y sus fragmentos, p. ej., ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopia de RMN o ESR. El efector molecular se puede anclar al anticuerpo o fragmento del mismo por cualquier método adecuado, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo se puede modificar para anclar al menos una molécula efectora como se describe en los documentos WO05/003171 o WO05/003170 (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia). Los documentos WO05/003171 o WO05/003170 también describen moléculas efectoras adecuadas.

35 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 completos, si fuera necesario. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un Fab' anti-TNF- α PEGilado, como se describe en el documento WO01/094585, que tiene preferiblemente anclado a uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada, un grupo derivado de lisil-maleimida en donde uno de los dos grupos amino del residuo de lisilo se ha conectado covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da, de tal manera que el peso molecular medio total de los residuos de metoxipoli(etilenglicol) es de aproximadamente 40.000 Da, más preferiblemente el grupo derivado de lisil maleimida es [1-[[[2-[[3-2,5-dioxo-1-pirrolidinil]-1-oxopropil]amino]etil]amino]-carbonil]-1,5-pentanodil]bis(iminocarbonilo).

En una realización, un Fab o Fab' según la presente descripción se conjuga con una molécula de albúmina de suero humano o una molécula de almidón.

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

Además se describen en la presente memoria células en las que una o más proteínas del anfitrión *E. coli* que se sabe que en el tipo salvaje se purifican conjuntamente con la proteína recombinante de interés durante la purificación, se seleccionan para la modificación genética, como describen Humphreys et al. "Engineering of *Escherichia coli* to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein", Protein Expression and Purification 37 (2004) 109-118 y documento WO04/035792 (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia). El uso de tales proteínas del anfitrión modificadas mejora el proceso de purificación de proteínas de interés, especialmente anticuerpos, producidos en *E. coli* alterando las propiedades físicas de proteínas de *E. coli* seleccionadas de manera que ya no se purifiquen simultáneamente con el anticuerpo recombinante. Preferiblemente la proteína de *E. coli* que se altera se selecciona entre una o más de las proteínas de unión a fosfato (PhoS/PstS), la proteína de unión a dipéptidos (DppA), la proteína de unión a maltosa (MBP) y la tiorredoxina.

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

También se describe la modificación de residuos específicos de la proteína de *E. coli* contaminante para alterar sus propiedades físicas, ya sea sola o combinada con la adición de etiquetas N o C-terminales. Tales cambios pueden incluir inserciones o deleciones para alterar el tamaño de la proteína o las sustituciones de aminoácidos para alterar el pI o el carácter hidrófobo. Estos residuos pueden estar localizados en la superficie de la proteína. En una realización concreta, los residuos de la superficie ilustrativos de la proteína PhoS se alteran con el fin de reducir el pI de la proteína. Los residuos que se ha determinado que son importantes en la unión del fosfato (Bass, documento US 5.304.472) se evitan con el fin de mantener una proteína PhoS funcional. Preferiblemente, se eligen como diana los residuos de lisina que se proyectan lejos de la superficie de la proteína o que están dentro o cerca de grandes grupos de residuos alcalinos. En un ejemplo, la proteína PhoS tiene una etiqueta de ácido poli(hexa)aspártico anclada al extremo C, mientras que los residuos de superficie en el extremo opuesto de la molécula se eligen como diana para la sustitución. Preferiblemente, los residuos de lisina seleccionados se sustituyen por ácido glutámico o ácido aspártico para conferir un mayor cambio potencial de pI que cuando se cambian residuos neutros por ácidos. La designación de un mutante de sustitución en la presente memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína de tipo salvaje. El número se refiere a la posición del aminoácido donde se realiza la sustitución del aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se utiliza para reemplazar el aminoácido de tipo salvaje. En mutaciones preferidas de PhoS en la presente invención, los residuos de lisina (K) 275, 107, 109, 110, 262, 265, 266, 309, 313 están sustituidos por ácido glutámico (E) o glutamina (Q), como mutaciones únicas o combinadas. Además, la lisina (K) 318 se puede sustituir por ácido aspártico (D) como una mutación única o combinada. Preferiblemente, las mutaciones únicas son K262E, K265E y K266E. Preferiblemente, las mutaciones combinadas son K265/266E y K110/265/266E. Más preferiblemente, todas las mutaciones se combinan con la etiqueta de poli(ácido aspártico) (poliD) anclada al extremo C y, opcionalmente, también con la sustitución K318D. En un ejemplo adicional, las mutaciones dan como resultado una reducción de pI de al menos 2 unidades. Preferiblemente, las mutaciones reducen el pI de PhoS de 7,2 a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5. En un ejemplo, el pI de la proteína PhoS de *E. coli* se reduce de 7,2 a aproximadamente 4,9, aproximadamente 4,8 y aproximadamente 4,5 utilizando las mutaciones polyD K318D, polyD K265/266E y polyD K110/265/266E respectivamente.

El polinucleótido que codifica la proteína de interés se puede expresar como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada por la célula anfitriona. Para las células anfitrionas procarióticas que no reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido nativo o eucariótico, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariótica. Las secuencias señal adecuadas incluyen OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA y DsbC.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de ligación convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

En una realización, se emplea un casete de expresión en la presente invención para que porte 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 de expresión reguladoras. Las una o más secuencias de expresión reguladoras pueden incluir un promotor. Las una o más secuencias de expresión reguladoras también pueden incluir una región no traducida 3' tal como una secuencia de terminación. Los promotores adecuados se comentan con más detalle a continuación.

En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención comprende un vector, tal como un plásmido. El vector comprende preferiblemente uno o más de los casetes de expresión definidos anteriormente.

En la realización en la que la proteína de interés es un anticuerpo que comprende cadenas tanto pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

El vector para su uso en la presente invención se puede producir insertando un casete de expresión como se definió anteriormente en un vector adecuado. Alternativamente, las secuencias de expresión reguladoras para dirigir la expresión de la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés pueden estar contenidas en el vector y, por lo tanto, se puede requerir solamente la región codificante del polinucleótido para completar el vector.

Los ejemplos de vectores que se pueden emplear para transformar la célula anfitriona con un polinucleótido de

acuerdo con la invención incluyen: un plásmido, tal como pBR322 o pACYC184, y/o un vector viral tal como un fago bacteriano, un elemento genético transponible tal como un transposón.

5 Se encuentran disponibles muchas formas de vectores de expresión. Tales vectores generalmente comprenden un origen plasmídico de replicación del ADN, un marcador seleccionable para antibióticos, un promotor y un terminador de la transcripción separados por un sitio de clonación múltiple (casete de expresión) y una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión al ribosoma.

10 Los promotores empleados en la presente invención se pueden conectar al polinucleótido relevante directamente o alternativamente se pueden ubicar en una posición apropiada, por ejemplo en un vector, de manera que cuando se inserta el polipéptido relevante, el promotor relevante puede actuar sobre el mismo. En una realización, el promotor está situado antes de la porción codificante del polinucleótido sobre el que actúa, por ejemplo, un promotor relevante antes de cada porción codificante de polinucleótido. Se pretende que "antes", como se emplea en la presente memoria, implique que el promotor está ubicado en el extremo 5 con respecto a la porción de polinucleótido codificante.

15 Los promotores pueden ser endógenos o exógenos con respecto a las células anfitrionas. 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 su uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia ribosómica de Shine-Dalgarno (S. D.) conectada operablemente al ADN que codifica el polipéptido de interés.

20 El vector de expresión también comprende preferiblemente un mensaje dicistrónico para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en los documentos WO 03/048208 o WO2007/039714 (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia). Preferiblemente, el cistrón aguas arriba contiene ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón aguas abajo contiene ADN que codifica la cadena pesada correspondiente, y la secuencia intergénica dicistrónica (IGS) comprende preferiblemente una secuencia seleccionada entre IGS1 (SEQ ID NO: 38), IGS2 (SEC ID NO: 39), IGS3 (SEC ID NO: 40) e IGS4 (SEC ID NO: 41).

25 Los terminadores pueden ser endógenos o exógenos con respecto a las células anfitrionas. Un terminador adecuado es rrmB.

30 Otros reguladores transcripcionales adecuados que incluyen promotores y terminadores y métodos de direccionamiento de proteínas se pueden encontrar en "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli" Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, septiembre de 1996, pág. 512-538.

La molécula de anticuerpo puede ser secretada de la célula o dirigida al periplasma mediante secuencias señal adecuadas. Alternativamente, las moléculas de anticuerpo se pueden acumular dentro del citoplasma de la célula. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo está dirigida al periplasma.

35 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, casetes de expresión y/o células anfitrionas que comprenden los componentes empleados en la misma, en la medida en que el aspecto relevante pueda aplicarse a la misma.

40 La presente invención también proporciona un método para producir una proteína recombinante de interés que comprende expresar la proteína recombinante de interés en una célula bacteriana gram negativa recombinante como se describe anteriormente para la presente invención.

La célula bacteriana gram negativa y la proteína de interés empleadas preferiblemente en el método de la presente invención se describen en detalle anteriormente.

45 Cuando el polinucleótido que codifica la proteína de interés es exógeno, el polinucleótido se puede incorporar a la célula anfitriona utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Normalmente, el polinucleótido se incorpora como parte de un vector de expresión que se transforma en la célula. En consecuencia, en un aspecto, la célula de acuerdo con la presente invención comprende un casete de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de interés.

La secuencia de polinucleótidos se puede transformar en una célula utilizando técnicas convencionales, por ejemplo empleando cloruro de rubidio, PEG o electroporación.

50 Como se describe adicionalmente en la presente memoria, el método también puede emplear un sistema de selección para facilitar la selección de células estables que se han transformado con éxito con el polinucleótido que codifica la proteína de interés. El sistema de selección típicamente emplea la co-transformación de una secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección. En un ejemplo, cada polinucleótido transformado en la célula comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica uno o más marcadores de selección. Por

consiguiente, la transformación del polinucleótido que codifica la proteína de interés y los uno o más polinucleótidos que codifican el marcador se produce conjuntamente y el sistema de selección se puede emplear para seleccionar las células que producen las proteínas deseadas.

5 Las células capaces de expresar los uno o más marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo ciertas condiciones impuestas artificialmente, por ejemplo, la adición de una toxina o antibiótico, debido a las propiedades otorgadas por el componente polipéptido/gen o polipéptido del sistema de selección incorporado en el mismo (p.ej., resistencia a los antibióticos). Esas células que no pueden expresar los uno o más marcadores no pueden sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas artificialmente. Las condiciones impuestas artificialmente se pueden elegir para que sean más o menos rigurosas, según se requiera.

10 Se puede emplear cualquier sistema de selección adecuado en la presente invención. Típicamente, el sistema de selección se puede basar en la inclusión en el vector de uno o más genes que proporcionan resistencia a un antibiótico conocido, por ejemplo un gen de resistencia a la tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina o ampicilina. Se pueden seleccionar las células que crecen en presencia de un antibiótico relevante ya que expresan tanto el gen que proporciona resistencia al antibiótico como la proteína deseada.

15 En una realización, el método según la presente invención comprende adicionalmente la etapa de cultivar la célula transformada en un medio para expresar de este modo la proteína de interés.

Se describen un sistema de expresión inducible o un promotor constitutivo que se pueden utilizar para expresar la proteína de interés. Los sistemas de expresión inducible y los promotores constitutivos adecuados son bien conocidos en la técnica.

20 Se puede utilizar cualquier medio adecuado para cultivar la célula transformada. El medio se puede adaptar para un sistema de selección específico, por ejemplo, el medio puede comprender un antibiótico, para permitir que solo las células que se han transformado con éxito crezcan en el medio.

25 Las células obtenidas del medio se pueden someter a una selección y/o purificación adicionales según se requiera. El método puede comprender adicionalmente una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés según se requiera.

El polipéptido se puede recuperar de la cepa, incluido el citoplasma, el periplasma o el sobrenadante.

En una realización, el anticuerpo se aísla del periplasma.

En una realización, la velocidad de alimentación posterior a la inducción está en el intervalo de 5 a 7,5 g/h, tal como aproximadamente 7 g/h.

30 El método o los métodos específicos utilizados para purificar una proteína dependen del tipo de proteína. Los métodos adecuados incluyen el fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía sobre sílice; cromatografía en una resina de intercambio iónico tal como S-SEPHAROSE y DEAE; cromatoenfoco; precipitación con sulfato de amonio; y filtración en gel.

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

40 El método también puede incluir una etapa adicional para medir la cantidad de expresión de la proteína de interés y seleccionar las células que tienen altos niveles de expresión de la proteína de interés.

El método también puede incluir una o más etapas adicionales de procesamiento aguas abajo, tales como PEGilación de la proteína de interés, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

45 Una o más etapas del método descritas en la presente memoria se pueden realizar combinadas en un recipiente adecuado tal como un biorreactor.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente descripción se pueden emplear en el tratamiento o la profilaxis.

50 Donde técnicamente se pueden combinar realizaciones apropiadas de la invención. Las realizaciones se describen en la presente memoria por comprender ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichos características/elementos. Las referencias técnicas en la presente memoria, tales como patentes y solicitudes, se incorporan a la presente memoria como referencia.

La presente invención se describe adicionalmente a modo de ilustración solamente en los siguientes ejemplos, que

se refieren a las figuras adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de líneas celulares

La generación de MXE016 y MXE017 se proporciona en el documento WO2011/086136.

5 **Generación de plásmidos para expresión de Fab' anti-FcRn y Fab' anti-FcRn con FkpA, Fab' anti-FcRn con skp y Fab anti-FcRn con la expresión tanto de FkpA como de skp**

10 Se construyó un plásmido que contenía las secuencias de las cadenas pesada y ligera de un Fab anti-FcRn (SEQ ID NO: 63 y 55, respectivamente). El plásmido PTTOD 1519.g57 Fab', se construyó utilizando metodologías de clonación de restricción convencionales que se pueden encontrar en Sambrook et al 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSHL Press, N.Y. El plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' contenía las siguientes características; un promotor *tac* fuerte y una secuencia del operador *lac*. El plásmido contenía un sitio de restricción EcoRI único después de la región codificante de la cadena pesada de Fab', seguido de una secuencia no codificante que contenía un sitio de unión a ribosoma fuerte y a continuación un sitio de restricción NdeI único.

15 Los genes de la cadena ligera, cadena pesada de Fab, se transcribieron como un solo mensaje policistrónico. El ADN que codificaba el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli* se fusionó al extremo 5' de las secuencias de los genes de las cadenas ligera y pesada, lo que dirigió la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó utilizando un terminador de transcripción doble *rrnB t1t2*. El gen *lacIq* codificaba la proteína represora lac I expresada constitutivamente. Esta transcripción reprimida desde el promotor *tac* hasta la desrepresión fue inducida por la presencia de alolactosa o IPTG. El origen de replicación utilizado fue p15A, que mantuvo un bajo número de copias. El plásmido contenía un gen de resistencia a la tetraciclina para la selección de antibióticos.

20 El plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, un vector de expresión para el Fab anti-FcRn y FkpA (un polipéptido periplásmico), se construyó ligando FkpA al extremo 3' de la secuencia Fab' de PTTOD 1519.g57 Fab' utilizando el Sitios EcoRI y NdeI (Véase la Figura 7d). El FkpA (SEQ ID N: 30) se construyó sintéticamente para eliminar 2 sitios Puv II, un sitio SfuI, un sitio BamHI y un EcoRI, de tal manera que la nueva construcción codificaba un sitio EcoRI 5' seguido de un sitio de unión ribosoma fuerte, seguido por el codón de inicio nativo, la secuencia señal y la secuencia madura de FkpA, terminando en una etiqueta His C-terminal y finalmente un sitio de unión a ribosoma fuerte seguido de un sitio NdeI no codificante. El fragmento de restricción EcoRI-NdeI se restringió y se ligó en el vector de expresión de modo que los tres polipéptidos: cadena ligera de Fab', cadena pesada de Fab' y FkpA se codificaron en un solo ARNm policistrónico.

25 El plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' Skp, un vector de expresión para el Fab anti-FcRn y Skp (un polipéptido periplásmico), se construyó ligando skp al extremo 3' de la secuencia Fab' del plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' utilizando los sitios EcoRI y NdeI. El skp (SEQ ID NO: 34) se construyó sintéticamente para eliminar 4 sitios Pst I y un sitio EcoRV, de modo que la nueva construcción codificaba un sitio EcoRI 5' seguido de un sitio de unión al ribosoma fuerte, seguido del codón de inicio nativo, la secuencia señal y la secuencia madura de Skp, terminando en una etiqueta His C-terminal y, finalmente, un sitio de unión a ribosoma fuerte seguido de un sitio NdeI no codificante. El fragmento de restricción EcoRI-NdeI se restringió y se ligó en el vector de expresión de modo que los tres polipéptidos: cadena ligera de Fab', cadena pesada de Fab' y skp se codificaron en un solo ARNm policistrónico.

30 El plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp, un vector de expresión para el Fab anti-FcRn, FkpA y Skp (ambos polipéptidos periplásmicos) se construyó ligando Skp en el plásmido PTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, en el extremo 3' de la secuencia de FkpA utilizando el sitio NdeI. El Skp (SEQ ID NO: 34) se construyó sintéticamente para eliminar 4 sitios Pst I y un sitio EcoRV, de manera que la construcción codificaba un sitio Ase I 5' incluyendo el codón de inicio nativo, la secuencia señal y la secuencia madura de skp, terminando en una etiqueta His C-terminal y finalmente un sitio NdeI no codificante. El fragmento de restricción AseI-NdeI se restringió y se ligó en el vector de expresión de manera que los cuatro polipéptidos: cadena ligera de Fab', cadena pesada de Fab', FkpA y Skp se codificaron en un solo ARNm policistrónico.

35 Fermentación de PTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp y pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA skp en *E. coli* W3110, MXE012 (*E. coli* W3110 spr H145A), MXE016 (*E. coli* W3110 ΔTsp, spr C94A) y MXE017 (*E. coli* W3110 ΔTsp, spr H145A). Las cepas de *E. coli* W3110, MXE012, MXE016 y MXE017 se transformaron con los plásmidos pTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp y pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp generados en el Ejemplo 1. La transformación de las cepas se llevó a cabo utilizando el método encontrado en Chung C.T et al. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS 86:2172-2175 (1989). Estas cepas transformadas se sometieron a prueba para determinar la expresión por fermentación.

40 **Ejemplo 2: Efecto de las chaperonas en la expresión de Fab':** Las cepas mostradas en la **Figura 1** se sometieron a prueba en experimentos de fermentación de 1 L y 2,5 L que comparaban la expresión de Fab':

Medio de crecimiento, inóculo y etapas de fermentación. El proceso de fermentación se inició preparando un inóculo a partir de un vial del banco de células y amplificándolo a través de varias fases de precultivo (matraz y reactores) antes de sembrar el fermentador de producción. En el fermentador de producción, las células se cultivaron en medios definidos a alta densidad en modo de lotes y alimentación por lotes. Cuando se alcanzó la densidad celular deseada, la expresión del Fab' se indujo mediante la adición de IPTG. La expresión de Fab' está dirigida al espacio periplásmico de *E. coli*, donde Fab' se acumula a lo largo del curso de la fase de inducción. Se aplicó una fuente de alimentación de carbono durante la fase de inducción para controlar la expresión y el crecimiento celular. La temperatura, el oxígeno disuelto (pO_2) y el pH se controlaron para mantener el cultivo en condiciones óptimas de cultivo.

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

Extracción periplásmica. Las células se recogieron de muestras de cultivo mediante centrifugación. La fracción de sobrenadante se retuvo (a -20°C) para un análisis adicional. La fracción de sedimento celular se resuspendió al volumen de cultivo original en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM; pH 7,4). Después de la incubación a 60°C durante aproximadamente 10 a 12 horas, el extracto se aclaró por centrifugación y la fracción de sobrenadante se utilizó recién obtenida o retenida (a -20°C) para el análisis.

Cuantificación de Fab'. Las concentraciones de Fab' en extractos periplásmicos y sobrenadantes de cultivo se determinaron utilizando HPLC con Proteína G. Se cargó una columna HP con Proteína G HiTrap de 1 ml (GE-Healthcare o equivalente) con analito (pH aproximadamente neutro, 30°C , filtrado a través de $0,2\ \mu\text{m}$) a 2 ml/min, la columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 50 mM pH 7,4 y a continuación se eluyó Fab' utilizando una inyección de glicina/HCl 50 mM, pH 2,7. El Fab' eluido se midió mediante A280 en un sistema de HPLC Agilent 1100 o 1200 y se cuantificó mediante la referencia a una curva patrón de una proteína Fab' purificada de concentración conocida.

La **Figura 1** muestra los resultados de 46 fermentaciones a la escala de 5 L realizadas con varias combinaciones de células anfitrionas y "chaperona". W3110 es una cepa de *E. coli* de tipo salvaje. Las diversas combinaciones fueron: tipo salvaje sin chaperona, tipo salvaje con FkpA y Skp, spr mutante MXE016 y Δ Tsp publicados en el documento WO2011/086136, MXE016 y FkpA, MXE016 y Skp, MXE016 y FkpA y Skp, MXE017 descritos en el documento WO2011/086136, MXE017 y FkpA y Skp.

Los resultados muestran que MXE016, MXE016 y FkpA, MXE016 y FkpA y Skp, y MXE017 y FkpA y Skp mostraron los mejores niveles de expresión.

Ejemplo 3: Efecto de la velocidad de alimentación posterior a la inducción

El efecto de tres velocidades de alimentación posteriores a la inducción 5,4, 6,0 y 7,0 g/h se sometió a prueba en MXE016 y MXE016 + FkpA.

Medio de crecimiento, inóculo y etapas de fermentación. El proceso de fermentación se inició preparando un inóculo a partir de un vial del banco de células y amplificándolo a través de varias etapas de precultivo (matraz y reactores) antes de sembrar el fermentador de producción. En el fermentador de producción, las células se cultivaron en medios definidos a alta densidad en modo de lotes y de alimentación por lotes. Cuando se alcanzó la densidad celular deseada, la expresión del Fab' se indujo mediante la adición de IPTG. La expresión de Fab' está dirigida al espacio periplásmico de *E. coli*, donde Fab' se acumula a lo largo del curso de la fase de inducción. Se aplicó una fuente de alimentación de carbono durante la fase de inducción para controlar la expresión y el crecimiento celular. En este experimento, la velocidad de alimentación se estableció en tres puntos de ajuste separados (que se muestran en la figura). La temperatura, el oxígeno disuelto (pO_2) y el pH se controlaron para mantener el cultivo en condiciones óptimas de cultivo.

La **Figura 2** muestra la cepa MXE016 transformada con plásmidos que no expresan chaperona ni FkpA. La figura muestra el efecto del aumento de la velocidad de alimentación posterior a la inducción sobre la producción y retención de Fab' en el periplasma con y sin FkpA. Los datos muestran que cuando la velocidad de alimentación aumenta sin la expresión de FkpA, el Fab' adicional producido se pierde en el sobrenadante. Este no es el caso con la expresión de FkpA donde el Fab' adicional producido a velocidades de alimentación más altas se retiene dentro del periplasma dando como resultado un título más alto.

Ejemplo 4: Análisis de rendimiento y viabilidad celular

Las Figuras 3A y B muestran el efecto sobre la viabilidad celular y el título de Fab' en MXE016 transformada con plásmidos que no expresan chaperona ni FkpA a escala de 20 L. La Figura 3A muestra que la viabilidad celular es más baja donde no está presente FkpA. 3b muestra que los títulos de Fab' fueron más altos y menos variables para MXE016 + FkpA.

La Figura 4 muestra que el título más alto con MXE016 + FkpA da como resultado 30% más de Fab' después de la recuperación del producto primario Fab'.

Las Figuras 5 y 6 muestran SDS-PAGE y transferencias Western de anti-etiqueta his de muestras de la recuperación primaria de MXE016 sin chaperona y MXE016 con expresión de FkpA.

5 Las muestras se cargaron de acuerdo con la concentración de Fab' con 1 µg de Fab' cargado por calle. Los geles tenían 4-20% de Tris-Glycine Novex y se ejecutaron en condiciones no reductoras a 125 V durante 2 horas. Los geles se tiñeron con colorante Sypro Ruby y se tomaron imágenes. Las transferencias Western se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando un sistema Invitrogen iBlot y a continuación se bloquearon con solución de caseína al 1%. Las membranas se sondearon a continuación con un anticuerpo anti-his conjugado con HRP (Novagen). Después, las transferencias se desarrollaron con solución ECL y se tomaron imágenes con un Amersham Life Sciences HyperProcessor.

10 **Listado de secuencias**

<110> UCB Pharma S.A

<120> Célula anfitriona bacteriana recombinante para la expresión de proteínas

<130> G0164-WO

15 <150> GB1208367.1

<151> 2012-05-14

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 2049

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

ES 2 704 425 T3

atgaacatgt tttttaggct taccgcgta 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 ttgagcgta ccagtacgct ttgtcggtag 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 gtttgccgct 660
 gaaatcgacc cgcataccaa ctatctttcc ccgcgtaata ccgaacagtt caaactgaa 720
 atgagtttgt cgctggaag tattggcgca gtgtgcaaa tggatgatga ctacaccgtt 780
 atcaattcga tggggcagc tgggtccgca gcgaagagta aagctatcag cgttggtgac 840
 aaaattgtcg gtgttggta aacaggcaag ccgatggttg acgtgattgg ctggcgtctt 900
 gatgatgtgg ttgccttaat taaagggccg aagggcagta aagttcgtct ggaaatttta 960
 cctgctggta aagggaccaa gaccctact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc 1020
 gaagaccgcg cggttaaaat gtcggtgaag accgtcggta aagagaaagt cggcgtgctg 1080
 gatattccgg gcttctatgt gggtttgaca gacgatgtca aagtgcaact gcagaaactg 1140
 gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcatc gacctgcgta gcaatggcgg tggggcgta 1200
 actgaagccg taccgctctc cggctctgtt attcctgcgg gtoccatgt tcaggtccgc 1260
 gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gataccgacg gacaggtttt ctataaaggc 1320
 ccgctggtgg tgctggttga ccgcttcagt gcttcggctt cagaaatctt tgccgcggca 1380
 atgcaggatt acggtcgtgc gctggttggt ggtgaaccga cgtttggtaa aggcaccggt 1440
 cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggccagcg 1500
 ctgggttctg tgcagtacac gatccagaaa ttctatcgcg ttaacggcgg cagtacgcaa 1560
 cgtaaaggcg taacgccaga catcatcatg ccgacgggta atgaagaaac ggaaacgggt 1620
 gagaaattcg aagataacgc gctgccgtgg gatagcattg atgccgcgac ttatgtgaaa 1680
 tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgctgaagg aacataatgc gcgtatcgcg 1740
 aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatcgcg gcttcaacgc tatgaaggac 1800
 aagcgcaata tcgtttctct gaattacgct gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat 1860
 gcgacgcgctc tggcgcggtt gaacgaacgc tttaaacgcg aaggtaaacc ggagttgaag 1920
 aaactggatg atctaccgaa agattaccag gagccggatc cttatctgga tgagacgggtg 1980
 aatatcgcac tcgatctggc gaagctttaa aaagccagac ccgcggaaca acccgctccc 2040
 gtcaagtaa 2049

<210> 2
 <211> 680

ES 2 704 425 T3

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

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

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

Leu Lys Glu Glu Thr Gln His Ala Thr Val Ser Glu Arg Val Thr Ser
35 40 45

Arg Phe Thr Arg Ser His Tyr Arg Gln Phe Asp Leu Asp Gln Ala Phe
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Leu Leu Asp Tyr Ser His
65 70 75 80

Asn Val Leu Leu Ala Ser Asp Val Glu Gln Phe Ala Lys Lys Lys Thr
85 90 95

Glu Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Asp Val Phe Tyr Asp
100 105 110

5

ES 2 704 425 T3

Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Lys Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Gln Tyr Ala
 115 120 125
 Leu Ser Val Leu Glu Lys Pro Met Asp Phe Thr Gly Asn Asp Thr Tyr
 130 135 140
 Asn Leu Asp Arg Ser Lys Ala Pro Trp Pro Lys Asn Glu Ala Glu Leu
 145 150 155 160
 Asn Ala Leu Trp Asp Ser Lys Val Lys Phe Asp Glu Leu Ser Leu Lys
 165 170 175
 Leu Thr Gly Lys Thr Asp Lys Glu Ile Arg Glu Thr Leu Thr Arg Arg
 180 185 190
 Tyr Lys Phe Ala Ile Arg Arg Leu Ala Gln Thr Asn Ser Glu Asp Val
 195 200 205
 Phe Ser Leu Ala Met Thr Ala Phe Ala Arg Glu Ile Asp Pro His Thr
 210 215 220
 Asn Tyr Leu Ser Pro Arg Asn Thr Glu Gln Phe Asn Thr Glu Met Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Gln Met Asp Asp Asp Tyr
 245 250 255
 Thr Val Ile Asn Ser Met Val Ala Gly Gly Pro Ala Ala Lys Ser Lys
 260 265 270
 Ala Ile Ser Val Gly Asp Lys Ile Val Gly Val Gly Gln Thr Gly Lys
 275 280 285
 Pro Met Val Asp Val Ile Gly Trp Arg Leu Asp Asp Val Val Ala Leu
 290 295 300
 Ile Lys Gly Pro Lys Gly Ser Lys Val Arg Leu Glu Ile Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Gly Lys Gly Thr Lys Thr Arg Thr Val Thr Leu Thr Arg Glu Arg Ile
 325 330 335
 Arg Leu Glu Asp Arg Ala Val Lys Met Ser Val Lys Thr Val Gly Lys
 340 345 350
 Glu Lys Val Gly Val Leu Asp Ile Pro Gly Phe Tyr Val Gly Leu Thr
 355 360 365

ES 2 704 425 T3

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

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

Ala Val Ser Leu Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ala Gly Pro Ile Val Gln
 405 410

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

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

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

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

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

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

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

Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Asn
 530 535 540

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

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

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

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

Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr Arg Leu Ala Arg

ES 2 704 425 T3

610

615

620

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

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

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

Ala Glu Gln Pro Ala Pro Val Lys
675 680

<210> 3

<211> 2048

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> gen Tsp desactivado mutado

<400> 3

```

atgaattcgt ttttaggctt accgcgtag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat      60
taattgtaga agatatcacg cgtgctgata aaattccggt attaaaggaa gagacgcagc      120
atgcgacggg aagtgagcgc gtaacgctgc gcttcacccg ttctcattat cgccagttcg      180
acctcgatca ggcattttcg gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctcgattaca      240
gccacaacgt gctgctggca agcgatgttg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag      300
gcgatgaact gcgttcaggc aaactcgacg tttctacga tctctacaat ctggcgcaaa      360
agcgcgcttt tgagcgctac cagtacgctt tgtcggctact ggaaaagccg atggatttca      420
ccggcaacga cacttataac cttgaccgca gcaaagcgcc ctggccgaaa aacgaggctg      480
agttgaacgc gctgtgggac agtaaagtca aattcgacga gttaagcctg aagctgacag      540
gaaaaacgga taaagaaatt cgtgaaaccc tgactcgccg ctacaaattt gccattcgtc      600
gtctggcgca aaccaacagc gaagatgttt tctcgtggc aatgacggcg tttgctcgtg      660
aatcgaccc  gcataccaac tatctttccc cgcgtaatac cgaacagttc aacctgaaa      720
tgagtttgtc gctggaaggt attggcgagc tgctgcaaat ggatgatgac tacaccgtta      780
tcaattcgat ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca      840
aaattgtcgg tgttggtcaa acaggcaagc cgatggttga cgtgattggc tggcgtcttg      900
atgatgtggt tgccttaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaaattttac      960
ctgctggtaa agggaccaag acccgtagct taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctcg     1020
aagaccgctc ggttaaaatg tcgggtgaaga ccgtcggtaa agagaaagtc ggcgtgctgg     1080

```

10

ES 2 704 425 T3

atattccggg cttctatgtg ggtttgacag acgatgtcaa agtgcaactg cagaaactgg 1140
 aaaaacagaa tgtcagcagc gtcatcatcg acctgcgtag caatggcggt ggggcgtaa 1200
 ctgaagccgt atcgcctctcc ggtctgttta ttctgcggg tcccattgtt caggtcccg 1260
 ataacaacgg caaggttcgt gaagatagcg ataccgacgg acaggttttc tataaagcc 1320
 cgctggtggt gctggttgac cgcttcagtg cttcggcttc agaaatcttt gccgcggcaa 1380
 tgcaggatta cgtcgtgcg ctggttgtgg gtgaaccgac gtttggtaaa ggcaccgttc 1440
 agcaataccg tcattgaac cgtatttacg atcagatggt acgtcctgaa tggccagcgc 1500
 tgggttctgt gcagtacacg atccagaaat tctatcgcgt taacggcggc agtacgcaac 1560
 gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg 1620
 agaaattcga agataacggc ctgccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat 1680
 caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcgca 1740
 aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcg cttcaacgct atgaaggaca 1800
 agcgcaatat cgtttctctg aattacgctg tgctgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
 cgacgcgtct gccgcgcttg aacgaacgct ttaaaccgca aggtaaaccg gagttgaaga 1920
 aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacggtga 1980
 atatcgact cgatctggcg aagcttgaaa aagccagacc cgcggaacaa cccgctccc 2040
 tcaagtaa 2048

<210> 4

<211> 2889

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 4

atgccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgcccttg gccaccctta 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 gtcgaaaag 300
 taccgcagg ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcgtag tcacaatgcc 360
 agcactgccc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgacgc cttgcctggt 420
 gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa 480
 cgtgagcgtg atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgccc 540
 atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt 600
 ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660

ES 2 704 425 T3

ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacgg	720
ctgccggagt tggcaaaaat ggcggcggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc	780
aaaaaacggg aaatcacctg gccggtagtc accgacgcgc aaaagggcat tatcattcat	840
tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcggtgagt ttcgcatcga taacaactca	900
gcgaagtccc gtagtaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtacacttt ctgactggct gaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc	1020
gacacctatc tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa	1080
ggcctggcta atocgatca ggttgtggcg 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 cgcggtatca ggctcgataaa	1440
atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg	1500
ccagagctta acccttatat tcctgatgat ttctcgtgta ttaagtcaga gaagaaatac	1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagcgt	1620
tattttgcca gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg	1680
gacagcgcgc gcaatcacgt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagc gctggcgcctt	1740
gatcagttaa gcaaccagge gtcggttggg ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac	1800
ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctggt ccaggcattg	1860
ctcgaggggt acttttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg	1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc	1980
gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc	2040
tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagc ggctcgacca	2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg	2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgcgaa acaaagatgt agtggctgat	2220
aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg	2280
gtattttgac 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

ES 2 704 425 T3

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
 attctgtgac agatttccgg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaaacaa tgcccctgat gagtgaaaag 2880
 aatgagtga 2889

<210> 5
 <211> 962
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<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

ES 2 704 425 T3

165	170	175
Asp Gly Met Arg Met Ala Gln Val Ser Ala Glu Thr Ile Asn Pro Ala 180	185	190
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
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
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
Arg Tyr Pro Ser Ile Thr Arg Asp Met Asp Tyr Val Glu Trp Leu Ala 405	410	415

ES 2 704 425 T3

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

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

ES 2 704 425 T3

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
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

ES 2 704 425 T3

<211> 2889
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> gen de proteasa III desactivado mutado

<400> 6

attccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgcccttg ggcacattaa	60
tgtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat	120
aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat	180
ccgcaggcag ttaaatacgt ctccggcgtg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc	240
gaggcgtagc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag	300
taccgcagc ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc	360
agcactgcgc cgtatcgac 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 taataaaccc	720
ctgccggagt tggcaaaaat ggcggcggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc	780
aaaaaacccg aaatcacccgt gccggtagtc accgacgcgc aaaaggcat tatcattcat	840
tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgtg cgcgttgagt ttcgcatcga taacaactca	900
gcgaagttcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc	1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa	1080
ggcctggcta atcgcgatca ggttgtggcg gcaatthtta gctatctcaa tctgttacgt	1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc	1200

ES 2 704 425 T3

cgttatccgt cgatcacccg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt 1260
 cgcggttctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa 1320
 gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc 1380
 ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgaat cgcggtatca ggtcgataaa 1440
 atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg 1500
 ccagagctta acccttatat tctgatgat ttctcgctga ttaagtcaga gaagaaatac 1560
 gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagccg 1620
 tattttgcc a cgcagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
 gacagcgcgc gcaatcaggt gatggttgcg 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
 gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc 2040
 tccattacgt tgaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggctcgacca 2100
 gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
 caaaaacagt tgggocgtga tggttcagag tgggtgcgaa acaaagatgt agtggtcgat 2220
 aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
 gtatttgtag cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctggtgggg 2340
 cagatcgtac agccgtggtt ctacaatcag ttgctgaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
 gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
 aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
 gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggttaattacc 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 gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaaacaa tgcccctgat gagtgaaaag 2880
 aatgagtga 2889

<210> 7
 <211> 1425
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 7

ES 2 704 425 T3

atgaaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcggtatct 60
 ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtggcca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgtta atacgccgcg tatgccgcgt aatttcagc agttcttcgg tgatgattct 240
 ccgttctgcc aggaaggttc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
 ggtaatggtg gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
 gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttggtg ataacgcgac ggtcattaaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
 gatatcgcgc tgatccaaat ccagaaccgg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccctgt tggctctgggc 600
 gagacggtaa cttccgggat tgtctctcgc ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
 tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactccgg tggcgcgctg 720
 gttaacctga acggcgaact gatcggatc aacaccgca tcctcgcacc ggacggcggc 780
 aacatcggta tcggttttgc tatcccagat aacatgggtg aaaacctgac ctgcgagatg 840
 gtggaatacg gccaggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaaactcc 900
 gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
 cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
 ggtaagcga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
 agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaagcgct 1200
 gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
 ccggtcgcgc agatcggcct gaagaaaggat gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcagagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Escherichia 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

ES 2 704 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 1425

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DegP mutado

<400> 9

atgaaaaaaa ccacattagc actgagtgc ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct

60

10

ES 2 704 425 T3

ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtgggtca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgtta atacgccgcg tatgccgcgt aatttccagc agttcttcgg tgatgattct 240
 ccgttctgcc aggaaggttc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
 ggtaatggtg gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
 gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttgttg ataacgcgac ggtcattaaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
 gatatcgcgc tgatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtacgcgattg gtaacccgtt tggctctgggc 600
 gagacggtaa cttccgggat tgtctctcgc ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
 tacgaaaact tcataccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacgccgg tgggtcgcgtg 720
 gttaacctga acggcgaact gatcggtatc aacaccgcga tcctcgcacc ggacggcggc 780
 aacatcggta tcggtttttc tatcccgagt aacatgggtga aaaacctgac ctgcgagatg 840
 gtggaatacg gccaggtgaa 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
 agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgtc 1200
 gagatgagca acaaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
 ccggctgcgc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

<210> 10
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> DegP mutado

<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

10

ES 2 704 425 T3

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

ES 2 704 425 T3

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

5
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción AseI
 <400> 13
 gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

10
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen Proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción AseI <400> 14
 gggaaaggcg gcggaaccgc ctag 24

20
 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción AseI
 <400> 15
 ctactgtgcc agcggtgga atgg 24

30
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción AseI
 <400> 16
 gcatcataat tttctttta cctc 24

<210> 17
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> gen spr de tipo salvaje
 <400> 17
 atggtcaaat ctcaaccgat tttgagatat atcttgcgcg ggattcccgc gattgcagta 60
 gcggttctgc tttctgcatg tagtgcaaat aacaccgcaa agaatatgca tcctgagaca 120
 cgtgcagtgg gtagtgaaac atcatcactg caagcttctc aggatgaatt tgaaaacctg 180
 gttcgtaatg tcgacgtaaa atcgcggaatt atggatcagt atgctgactg gaaaggcgt 240
 cgttatcgtc tggcgggcag cactaaaaaa ggtatcgatt gttctggttt cgtacagcgt 300
 acattccgtg agcaatttgg cttagaactt ccgcgttcga cttacgaaca gcaggaaatg 360
 ggtaaatctg tttcccgcag taatttgcgt acgggtgatt tagttctgtt ccgtgccggt 420
 tcaacgggac gccatgtcgg tatttatatc ggcaacaatc agtttgtcca tgcttccacc 480
 agcagtggtg ttattatttc cagcatgaat gaaccgtact ggaagaagcg ttacaacgaa 540
 gcacgccggg ttctcagccg cagc 564

ES 2 704 425 T3

<210> 18
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 18
 Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro
 1 5 10 15

 Ala Ile Ala Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Cys Ser Ala Asn Asn Thr
 20 25 30

 Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val Gly Ser Glu Thr Ser
 35 40 45

 Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg Asn Val
 50 55 60

 Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val
 65 70 75 80

 Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly
 85 90 95

 Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly Leu Glu Leu Pro Arg
 100 105 110

 Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser Val Ser Arg Ser Asn
 115 120 125

 Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly Arg
 130 135 140

 His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr
 145 150 155 160

 Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu Pro Tyr Trp Lys Lys
 165 170 175

 Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser
 180 185

10

<210> 19
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <400> 19

ES 2 704 425 T3

Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala
 1 5 10 15

Val Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu
 20 25 30

Asn Leu Val Arg Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr
 35 40 45

Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys
 50 55 60

Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys
 85 90 95

Ser Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg
 100 105 110

Ala Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln
 115 120 125

Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn
 130 135 140

Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Ser

- <210> 20
- <211> 954
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una secuencia OmpT mutada que comprende mutaciones D210A y H212A

- <400> 20

ES 2 704 425 T3

```

atgCGGGGga aacttctggg aatagtcctg acaacccta ttgCGatcag ctcttttGct      60
tctaccgaga ctttatcggt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttGgaact      120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagccgaag aaggaggccg aaaagtCagt      180
caactcgact gaaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg      240
atgccccaga tatctatcgg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat      300
atggtcgatc aggactggat ggattccagt aaccccgaa cctggacgga tgaaagtaga      360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc      420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggccggat atcaggaaaag ccgttatagc      480
tttacagcca gaggtgggtc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc      540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaaac aacgttttaa aatgcctac      600
attggcttga ctggaagtta tcgttatgaa gattttgaac tcggtggcac atttaaatac      660
agcggctggg tggaatcatc tgataacgct gaagcttatg acccgggaaa aagaatcact      720
tatcgcagta aggtcaaaga ccaaaattac tattctggtg cagtcaatgc aggttattac      780
gtcacaccta acgcaaaagt ttatggtgaa ggcgcatgga atcgggttac gaataaaaaa      840
ggtaactatt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aatggagca      900
ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa          954

```

<210> 21

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia OmpT mutada que comprende mutaciones D210A y H212A

<400> 21

ES 2 704 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 425 T3

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 954

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia OmpT desactivada mutada

<400> 22

```

attcggggcga aacttctggg aatagtcctg acaaccoccta ttgogatcag ctcttttgc 60
tctaccgaga ctttatcgtt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact 120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagccgaag aaggaggccg aaaagtcagt 180
caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg 240
atgccccaga tatctatcgg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
atggtcgcgc aggactggat ggattccagt aaccccgga cctggacgga tgaaagtaga 360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggccggat atcaggaaag ccgttatagc 480
tttacagcca gaggtggttc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc 540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaaac aacgttttaa aatgccctac 600
attggcttga ctggaagtta tcgttatgaa gattttgaac tcggtggcac atttaaatac 660
agcggctggg tggaatcatc tgataacgat gaacactatg acccgggaaa aagaatcact 720
tatcgcagta aggtcaaaga ccaaaattac tattctgttg cagtcaatgc aggttattac 780
gtcacaccta acgcaaaagt ttatgttgaa ggcgcatgga atcgggttac gaataaaaaa 840
ggtaataactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aaatggagca 900
ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa 954
    
```

10 <210> 23

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> adaptador oligonucleotídico OmpA

<400> 23

cgattgaatg gagaacttga atfcgggcga aacttctggg aatag 45

ES 2 704 425 T3

<210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 1 (IGS1) para la expresión de Fab en *E. coli*

<400> 24
aagtttaat agaggagagt gttaatgaag aag 33

10 <210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 2 (IGS2) para la expresión de Fab en *E. coli*.

<400> 25
aagtttaat agaggggagt gtaaaatga agaag 35

20 <210> 26
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 3 (IGS3) para la expresión de Fab en *E. coli*

<400> 26
aagctttaat agaggagagt gttgaggagg aaaaaaaaaat gaagaaa 47

30 <210> 27
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 4 (IGS4) para la expresión de Fab en *E. coli*

<400> 27
aagctttaat agaggagagt gttgacgagg attatataat gaagaaa 47

35 <210> 28
<211> 810
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 28

ES 2 704 425 T3

atgaaatcac tgtttaaagt aacgctgctg gcgaccacaa tggccggtgc cctgcatgca 60
 ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctacag ctgctgacag caaagcagcg 120
 ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcaactgggtg cctcgctggg tcggttacatg 180
 gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcatcaaac tggataaaga tcagctgatc 240
 gctggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaaactct ccgaccaaga gatcgaacag 300
 actctacaag cattcgaagc tcgctggaag tcttctgctc aggcgaagat ggaaaaagac 360
 gcggtgata acgaagcaaa aggtaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaaggt 420
 gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca 480
 ccgaaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaggta cgctgatcga cggtaaagag 540
 ttcgacaact cttacaccgg tgggtgaaccg ctttctttcc gtctggacgg tgttatcccg 600
 ggttggacag aaggtctgaa gaacatcaag aaaggcggta agatcaaact ggttattcca 660
 ccagaactgg cttacggcaa agcgggtggt ccggggatcc caccgaattc taccctggtg 720
 tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca ggcgccgaag ctgatgcaaa gccggaagct 780
 gatgcgaaag ccgcagattc tgctaaaaaa 810

<210> 29
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 29
 Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30
 Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln

ES 2 704 425 T3

85 90 95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
100 105 110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
115 120 125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
195 200 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
260 265 270

<210> 30

<211> 828

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> el gen FkpA etiquetado

<400> 30

atgaaatcac tgtttaaagt aacgctgctg gcgaccacaa tggccgttgc cctgcacgca 60

ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctactg ctgctgacag caaagcagcg 120

ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg cctcgctggg tcgttacatg 180

gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcataaac tggataaaga tcaactgatc 240

10

ES 2 704 425 T3

gctggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaaactct ccgaccaaga gatcgaacag 300
 actctacaag cattedgaagc tcgctggaag tcttctgctc aggcgaagat ggaaaaagac 360
 gcggtctgata acgaagcaaa aggtaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaaggt 420
 gtgaaaaact cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca 480
 ccgaaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaggta cgctgatcga cggtaaagag 540
 ttcgacaact cttacacccg tgggtgaaccg ctttctttcc gtctggacgg tgttatcccg 600
 ggttgacag aaggtctgaa gaacatcaag aaagcggta agataaaact ggttattcca 660
 ccagaactgg cttacggcaa agcgggtggt ccggggattc caccaaattc taccctggtg 720
 tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gcgccgaagg ctgatgcaaa gccggaagct 780
 gatgcgaaag ccgcagattc tgctaaaaaa caccatcacc atcaccac 828

<210> 31

<211> 276

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> gen FkpA etiquetado con his

<400> 31

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

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125

10

ES 2 704 425 T3

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys His His
 260 265 270

His His His His
 275

<210> 32
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 32
 gtgaaaaagt ggttattagc tgcaggtctc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg 60
 gctgacaaaa ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc 120
 ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact gcagcgtatg 180
 gaaaccgatc tgcaggctaa aatgaaaaag ctgcagtcca tgaaagcggg cagcgatcgc 240
 actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct 300
 tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgcg gcaaactggt tactcgtatc 360
 cagactgctg tgaaatccgt tgccaacagc caggatatcg atctggttgt tgatgcaaac 420
 gccgttgctt acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt 480
 aaataa 486

10

<210> 33
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 33

ES 2 704 425 T3

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

Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
 20 25 30

Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
 35 40 45

Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
 50 55 60

Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
 65 70 75 80

Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
 85 90 95

Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
 115 120 125

Asn Ser Gln Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
 130 135 140

Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
 145 150 155 160

Lys

<210> 34

<211> 501

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> gen skp etiquetado

<400> 34

atgaaaaagt ggttattagc cgcaggtctc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg 60

gctgacaaaa ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc 120

ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact ccagcgtatg 180

gaaaccgatc tccaggctaa aatgaaaaag ctgcaatcca tgaaagcggg cagcgcgatcgc 240

actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct 300

tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgcg gcaaactggt tactcgtatc 360

cagactgctg tgaatccgt tgccaacagc caggaaatcg atctggttgt tgatgcaaac 420

gccgttgctt acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt 480

aaacaccatc accatcacca c 501

10 <210> 35

<211> 167

ES 2 704 425 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> gen skp etiquetado

5 <400> 35
 Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
 35 40 45
 Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
 50 55 60
 Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
 65 70 75 80
 Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
 85 90 95
 Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
 115 120 125
 Asn Ser Gln Glu Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
 130 135 140
 Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
 145 150 155 160
 Lys His His His His His His
 165

10 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CA170 1519 Ab CDRH1

15 <400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CA170_1519 Ab CDRH2

<400> 37

ES 2 704 425 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg Ser Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

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

Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

5 <210> 43
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región de Rat Ab 1519 VL

10 <400> 43
 gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttgaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca ggcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg 120
 ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgac cacactggac 180
 tctggaattc ctgatagggt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc 240
 cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct 300
 cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa 336

15 <210> 44
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región de Rat Ab 1519 VL

<400> 44

ES 2 704 425 T3

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln
1 5 10 15

Gly Thr Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
20 25 30

Val Ala Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg
50 55 60

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

Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys
130

- 5 <210> 45
- <211> 396
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región de Rat Ab 1519 VL

- 10 <400> 45
- atgatgagtc ctgccagtt cctgtttctg ctgatgctct ggattcaggg aaccagtgg 60
- gatgttgga tgaccagac tccactgtct ttgtcggtg cccttgaca accagcctcc 120
- atctcttgca agtcaagtca ggcctcgta ggtgctagt gaaagacata tttgtattgg 180
- ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctgggtgc cacactggac 240
- tctggaattc ctgataggt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc 300
- cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct 360
- cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa 396

- <210> 46
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región Rat Ab 1519 VH

<400> 46

ES 2 704 425 T3

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

5 <210> 47
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región Rat Ab 1519 VH

10 <400> 47
gaggtgccgc tgggtggagtc tggggggcggc tcagtgcagc ctggggaggtc catgaaactc 60
tcctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tgggtctgggt ccgccaggct 120
ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat attgattctg atggtgataa tacttactac 180
cgagattccg tgaagggccg attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat 240
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt 300
gtccggccct ttctctattg gggccaagga accacgggtca ccgtctcg 348

15 <210> 48
<211> 135
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región de Rat Ab 1519 VH

<400> 48

ES 2 704 425 T3

Met Asp Ile Ser Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Val Arg Cys Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135

5 <210> 49
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región de Rat Ab 1519 VH

10 <400> 49
 atggacatca gtctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaagggtg ccggtgtgag 60
 gtgccgctgg tggagtctgg gggcggctca gtgcagcctg ggagggtccat gaaactctcc 120
 tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtccg ccaggctcca 180
 aagaagggtc tggagtgggt cgcatatatt gattctgatg gtgataatac ttactaccga 240
 gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaaataatg caaaaagcac cctatatttg 300
 caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggattgtc 360
 cggccctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcaccg tctcg 405

<210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> región de 1519 gL20 V
 <400> 50

ES 2 704 425 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 Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 51
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región de 1519 gL20 V

10 <400> 51
 gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaccta cctgtactgg 120
 ctcttccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat 180
 agcggatttc cgtctcgttt ctccgtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt 240
 agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg 300
 cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaa 336

15 <210> 52
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región de 1519 gL20 V

<400> 52
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

20 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln

ES 2 704 425 T3

35

40

45

Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys
130

<210> 53

<211> 399

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región de 1519 gL20 V

<400> 53

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtcg gtttcgctac cgtagcgcaa 60

gctgatatcc agatgaccga gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120

actattacct gtaaaagctc ccagtcctcg gtgggtgcaa gcggcaaac ctacctgtac 180

tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg 240

gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc 300

attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt 360

ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaa 399

10 <210> 54

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cadena ligera 1519 gL20 (V + constante)

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

ES 2 704 425 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 55

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera 1519 gL20 (V + constante)

<400> 55

ES 2 704 425 T3

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaccta cctgtactgg 120
 ctctccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgcctgatct atctggtgtc taccctggat 180
 agcggtattc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt 240
 agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg 300
 cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc 360
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgt 657

<210> 56

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cadena ligera 1519 gL20

<400> 56

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
 35 40 45

Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

10

ES 2 704 425 T3

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 57
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera 1519 gL20 <400> 57
 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgaccga gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtaaaagctc ccagtcctcg gtgggtgcaa gggcaaac ctacctgtac 180
 tggctcttcc agaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg 240
 gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc 300
 attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt 360
 ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaac gtacggtagc ggccccatct 420
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctacgacgca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtg 720

<210> 58
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> región de 1519 gH20 V

15 <400> 58

ES 2 704 425 T3

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

<210> 59
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> región de 1519 gH20 V

<400> 59
 gaggttccgc tggctcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag tatctggctt cacgttctcc aactacggta tgggtgtgggt tcgtcaggct 120
 ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactccg acggcgacaa cacctactat 180
 cgcgactctg tgaaggtcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc 300
 gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcg 348

<210> 60
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> región de 1519 gH20 V

15

<400> 60

ES 2 704 425 T3

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135

<210> 61
<211> 411
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región de 1519 gH20 V

<400> 61
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgagggtc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttggtg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag 180
gctccaggta aaggctctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac 240
tattcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcca atccagcctg 300
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg caccactggc 360
atcgtgcgctc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc g 411

<210> 62
<211> 228
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena pesada de Fab' 1519gH20 (V + CH1 gamma 1 humana + bisagra)
<400> 62

ES 2 704 425 T3

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

Thr Cys Ala Ala
225

<210> 63
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena pesada de Fab' 1519gH20 (V + CH1 gamma 1 humana + bisagra)

10 <400> 63

ES 2 704 425 T3

```

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag tatctggctt cacgttctcc aactacggta tgggtgtgggt tcgtcaggct      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactccg acggcgacaa cacctactat      180
cgcgactctg tgaagggtcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc      300
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcgag cgcttctaca      360
aagggcccat cggctttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg      420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca      480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac      540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc      600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgacaaga aagttgagcc caaatcttgt      660
gacaaaactc acacatgctc cgcg                                             684

```

```

<210> 64
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

```

5

```

<220>
<223> cadena pesada de Fab' 1519gH20

```

```

<400> 64
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1           5           10          15

```

10

ES 2 704 425 T3

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
 35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 245

<210> 65

<211> 747

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cadena pesada de Fab' 1519gH20

<400> 65

ES 2 704 425 T3

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttggt cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatgggtgtg ggttcgtcag 180
gctccaggta aaggctctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac 240
tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcca atccagcctg 300
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgctg tgtactattg caccactggc 360
atcgtgcgtc cgtttctgta ttgggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagcgttct 420
acaaagggcc catcggctct cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaatct 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 747

<210> 66

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada de Fab' 1519gH20 IgG4 (V + gamma 4P humana constante)<400> 66

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

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

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

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

ES 2 704 425 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

ES 2 704 425 T3

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 67
 <211> 1939
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada 1519gH20 IgG4 (V + gamma 4P humana constante, exones)

<400> 67
 gaggtaccac ttgtgaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc 60
 tcttgtgctg tgtctggctt caccttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca 120
 cctgaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat 180
 cgggattccg tgaaaggacg cttcacaatc tcccagata acgccaagag ctactgtac 240
 ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actattgcac aacgggaatc 300
 gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag cgcttctaca 360
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 480
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540
 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca 660
 cagggagggga ggggtgtctgc tggaagccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccg 720

10

ES 2 704 425 T3

ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgccccatc tgtctcctca cccggaggcc 780
tctgaccacc ccaactcatgc ccagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctccgg 840
gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc 900
tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaaag ccaccccaaa 960
ggccaaaactc tccaactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc 1020
ccaatcttct ctctgcagag tccaaatag gtccccatg cccaccatgc ccaggtaaag 1080
caaccaggc ctcgcctcc agctcaaggc gggacagggtg ccctagagta gcctgcatcc 1140
agggacaggc cccagccggg tgctgacgca tccacctcca tctcttcctc agcacctgag 1200
ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 1260
tcccggacct ctgaggtcac gtgctgtgtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 1320
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1380
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1440
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1500
aaaaccatct ccaaagccaa aggtgggacc cacgggggtgc gagggccaca tggacagagg 1560
tcagctcggc ccaccctctg ccctgggagt gaccgctgtg ccaacctctg tccctacagg 1620
gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa 1680
ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 1740
ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga 1800
cggctccttc ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcagggtggc aggaggggaa 1860
tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct 1920
ctccctgtct ctgggtaaa 1939

<210> 68

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera FabFv 1519gL20

<400> 68

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 Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

10

ES 2 704 425 T3

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
225 230 235 240

Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr
260 265 270

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser
275 280 285

Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

ES 2 704 425 T3

290

295

300

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
305 310 315 320

Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe
325 330 335

Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
340 345

<210> 69

<211> 1041

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera FabFv 1519gL20

<400> 69

```

gatatccaga tgacctagag cccatctagc ttatccgctt ccggttggtga tcgctgtgaca      60
attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg gcaagacctt tctgtactgg      120
ctctttcaga agcctggcaa ggcacccaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac      180
tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt      240
tcatcgctgc aaccggagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttccct      300
cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg      540
agcagcaccg tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaaagtgtg cgcctgcgaa      600
gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc      660
ggtgccggtg gcagtggtgg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc      720
cagagtcctt catcggatc cgcgtccggt ggcgataggg tgactattac atgtcaaagc      780
tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaaccggg gaaggctcca      840
aaacttctga tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc      900
tctggatcag ggacagactt caggttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgag      960
acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtgata cgacatttgg gtgctgtact     1020
aaggtggaaa tcaaactgac c                                     1041
    
```

10 <210> 70

<211> 367

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cadena ligera FabFv 1519gL20

<400> 70

ES 2 704 425 T3

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

ES 2 704 425 T3

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
245 250 255

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp
260 265 270

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe
275 280 285

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
290 295 300

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
325 330 335

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser
340 345 350

Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
355 360 365

<210> 71

<211> 1101

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera FabFv 1519gL20 <400> 71

```

atgtctgtcc ccaccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgccagatgc      60
gatatccaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt ccggttggtga tcgcgtgaca      120
attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg gcaagaccta tctgtactgg      180
ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac      240
tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt      300
tcatcgtctc aaccggagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttcctt      360
cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
    
```

ES 2 704 425 T3

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 600
 agcagcacc cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc 720
 ggtggcgggtg gcagtggtgg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc 780
 cagagtcctt catcggtatc cgcgtccggt ggcgataggg tgactattac atgtcaaagc 840
 tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaaccggg gaaggctcca 900
 aaacttctga tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc 960
 tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgcg 1020
 acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtgata cgacatttgg gtgcggtact 1080
 aagtggaata tcaaactgac c 1101

<210> 72
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada FabFv 1519gH20

<400> 72
 Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

10

ES 2 704 425 T3

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
 275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
 290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
 325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
 355

<210> 73

<211> 1071

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cadena pesada FabFv 1519gH20

<400> 73

ES 2 704 425 T3

gaggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc 60
 tcttgtgctg tgtctggcct caccttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca 120
 cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat 180
 cgggattccg tgaaggagc cttcacaatc tcccagagata acgccaagag ctactgtac 240
 ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actattgcac aacgggaatc 300
 gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc acctgggta ctgtctcgag cgcgtccaca 360
 aagggcccat cgttcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccag tgacgggtgc gtggaactca 480
 ggtgcctctga ccagcggcgt tcacaccttc ccggtgtcc tacagtcttc aggactctac 540
 tccctgagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgataaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 agtggaggtg ggggctcag tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg 720
 cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggaggagcc tgcgtctctc ttgtgcagta 780
 agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840
 ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa 900
 ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960
 ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact 1020
 gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg acctgggtga ctgtttcaag t 1071

<210> 74

<211> 376

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada FabFv 1519gH20 <400> 74

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

Val His Ser Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe

ES 2 704 425 T3

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly
 290 295 300

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 325 330 335

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 340 345 350

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 5' Tsp de tipo salvaje

<400> 75

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
 20

10 <210> 76

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> 5' Tsp de tipo salvaje <400> 76

atgaacatgt ttttttaggct taccgcgta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60

ttcgct 66

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 5' Tsp mutado

<400> 77

Met Asn Ser Phe Leu Gly Leu Pro Arg Leu Ala Cys Leu Gln Gln Ala
 1 5 10 15

Arg His Leu

25 <210> 78

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 704 425 T3

<223> fragmento 5' Tsp mutado <400> 78
atgaattcgt ttttaggctt accgcgtag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60

taattg 66

<210> 79
<211> 20
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 5' (proteasa III) ptr delta mutada

<400> 79
Ile Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

10 Trp Ala His Cys
20

<210> 80
<211> 66
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> 5' (proteasa III) ptr delta mutada

<400> 80
tgaattcccc gcagcacctg gttcaaagca ttattggtgt tagttgccct ttgggcacat 60

taatgt 66

<210> 81
20 <211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 5' (proteasa III) ptr de tipo salvaje

25 <400> 81
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
20

<210> 82
30 <211> 66
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> 5' (proteasa III) ptr de tipo salvaje <400> 82
tgaatgcccc gcagcacctg gttcaaagca ttattggtgt tagttgccct ttgggcaccc 60

ttaagt 66

35

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana gram negativa recombinante que comprende:

a. un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados entre D133, H145, H157, N31, R62, 170, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 y G147 y

b. un vector de expresión que comprende un gen que expresa o expresa en exceso una o más proteínas capaces de facilitar el plegamiento de proteínas seleccionadas entre FkpA, Skp o una combinación de FkpA y Skp,

en donde la célula tiene una actividad de proteína Tsp reducida en comparación con una célula de tipo salvaje y en donde la célula no comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y en donde la célula bacteriana es isogénica con respecto a una célula de E. coli de tipo salvaje, excepto por el gen spr mutado y la modificación requerida para reducir la actividad de la proteína Tsp en comparación con una célula de tipo salvaje.

2. Una célula según la reivindicación 1, en donde el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una o más mutaciones seleccionadas entre D133A, H145A, H157A, N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C y G147C.

3. Una célula según la reivindicación 1, en donde el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene las mutaciones C94 y H145A.

4. Una célula según la reivindicación 1, en donde el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación seleccionada entre D133A, H145A y H157A.

5. Una célula según la reivindicación 1, en donde el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación seleccionada entre C94A.

6. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde el gen spr mutante está integrado en el genoma de la célula.

7. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde un gen que codifica una proteína capaz de facilitar el plegamiento de proteínas se transfecta transitoriamente a la célula.

8. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la proteína capaz de facilitar el plegamiento de proteínas es FkpA.

9. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la célula comprende adicionalmente uno o más de los siguientes genes mutados:

a. un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida;

b. un gen ptr mutado, en donde el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad de proteasa reducida o es un gen ptr mutado desactivado; y

c. un gen OmpT mutado, en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT que tiene actividad proteasa reducida o es un gen OmpT mutado desactivado.

10. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la célula comprende un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene actividad proteasa reducida o es un gen Tsp mutado desactivado.

11. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la célula tiene un gen Tsp mutado desactivado que comprende una mutación en el codón de inicio y/o uno o más codones de parada del gen situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de parada del gen.

12. Una célula según la reivindicación 11, en donde el gen Tsp mutado desactivado comprende un sitio para un marcador de restricción creado por una mutación de cambio de sentido en el codón de inicio del gen y opcionalmente una o más mutaciones puntuales adicionales.

13. Una célula según la reivindicación 12, en donde el gen Tsp mutado desactivado comprende SEQ ID NO: 3.

14. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la célula es E. coli.

15. Una célula según la reivindicación 14, en donde E coli es la cepa K12 o W3110.

16. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde la célula comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés seleccionada entre un anticuerpo o un fragmento de unión a

antígeno del mismo.

17. Una célula según la reivindicación 16, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para FcRn.

5 18. Un método para producir una proteína de interés que comprende cultivar una célula bacteriana gram negativa recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en un medio de cultivo en condiciones eficaces para expresar la proteína recombinante de interés y recuperar la proteína recombinante de interés del periplasma de la célula bacteriana gram negativa recombinante y/o del medio de cultivo.

19. Un método según la reivindicación 18, en donde el método comprende adicionalmente recuperar la proteína de interés de la célula.

10 20. Un método según la reivindicación 19, en donde la proteína de interés se recupera del periplasma y/o del sobrenadante.

Figura 1

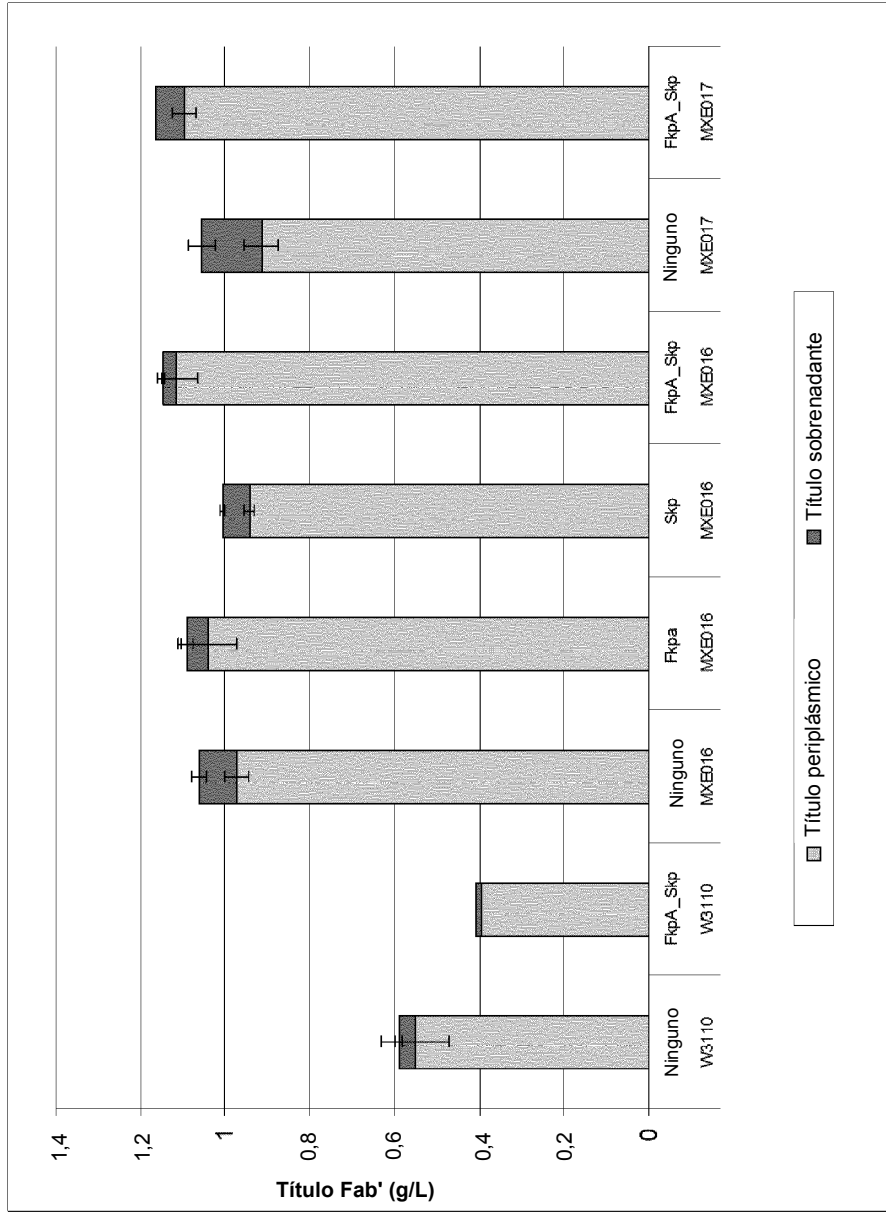


Figura 2 Experimentos de variación de la velocidad de alimentación

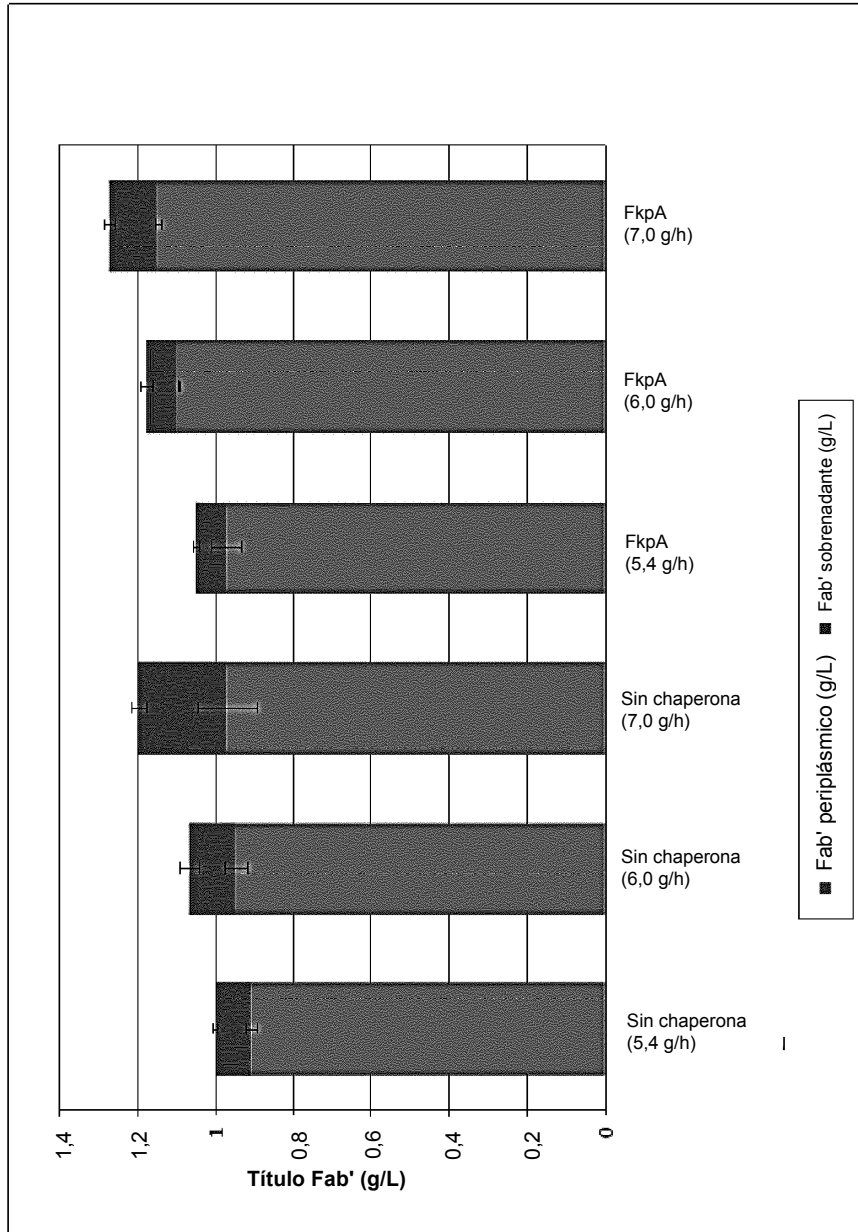


Figura 3A Viabilidad celular

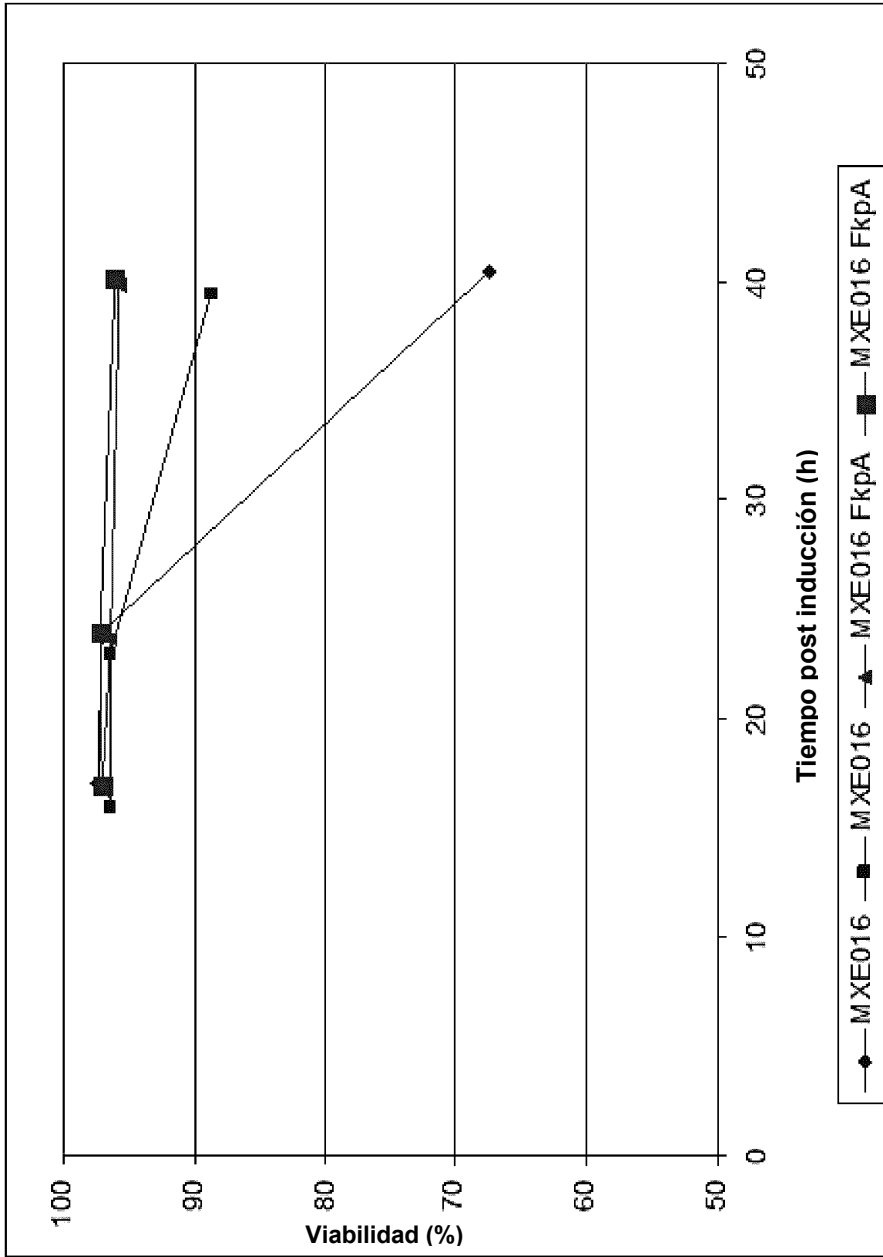


Figura 3B

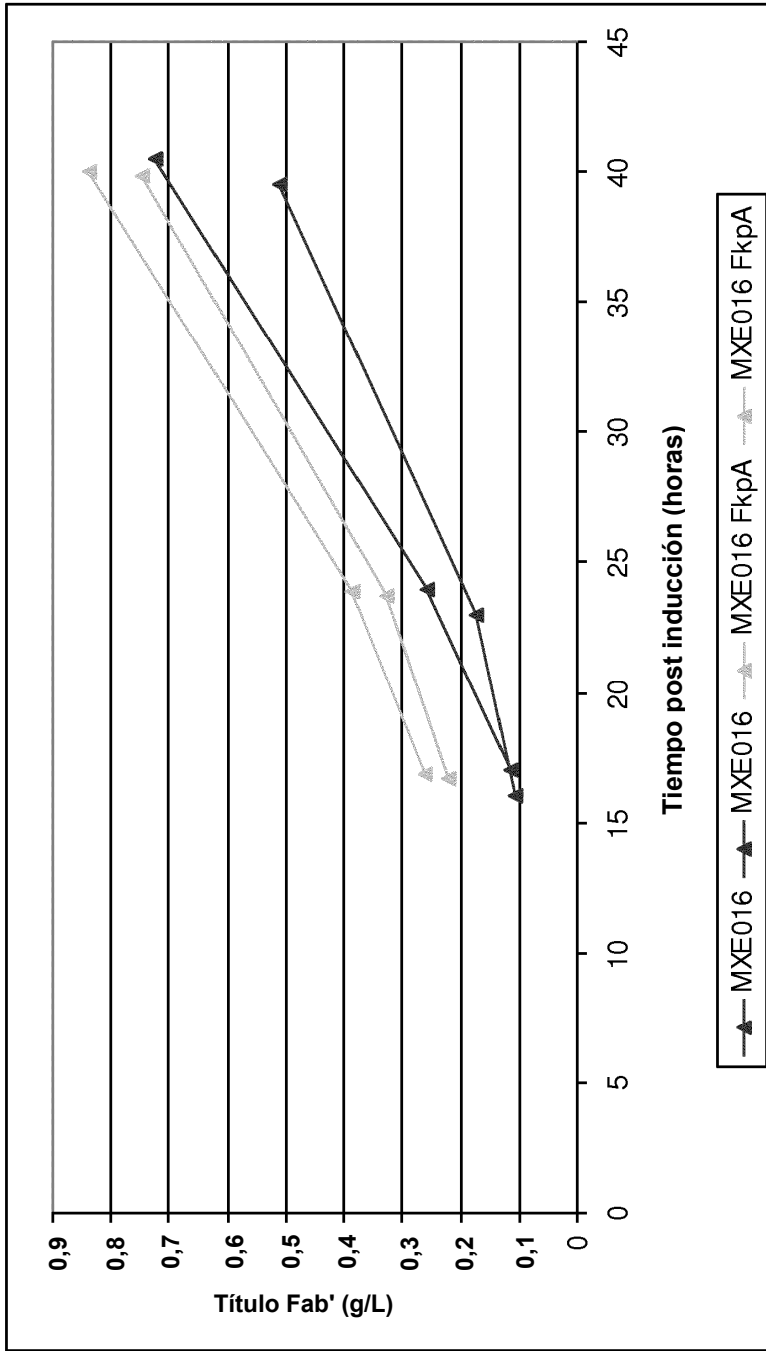


Figura 4 Cosecha de producciones a escala piloto de 20 litros y recuperación primaria para líneas celulares "MXE016"

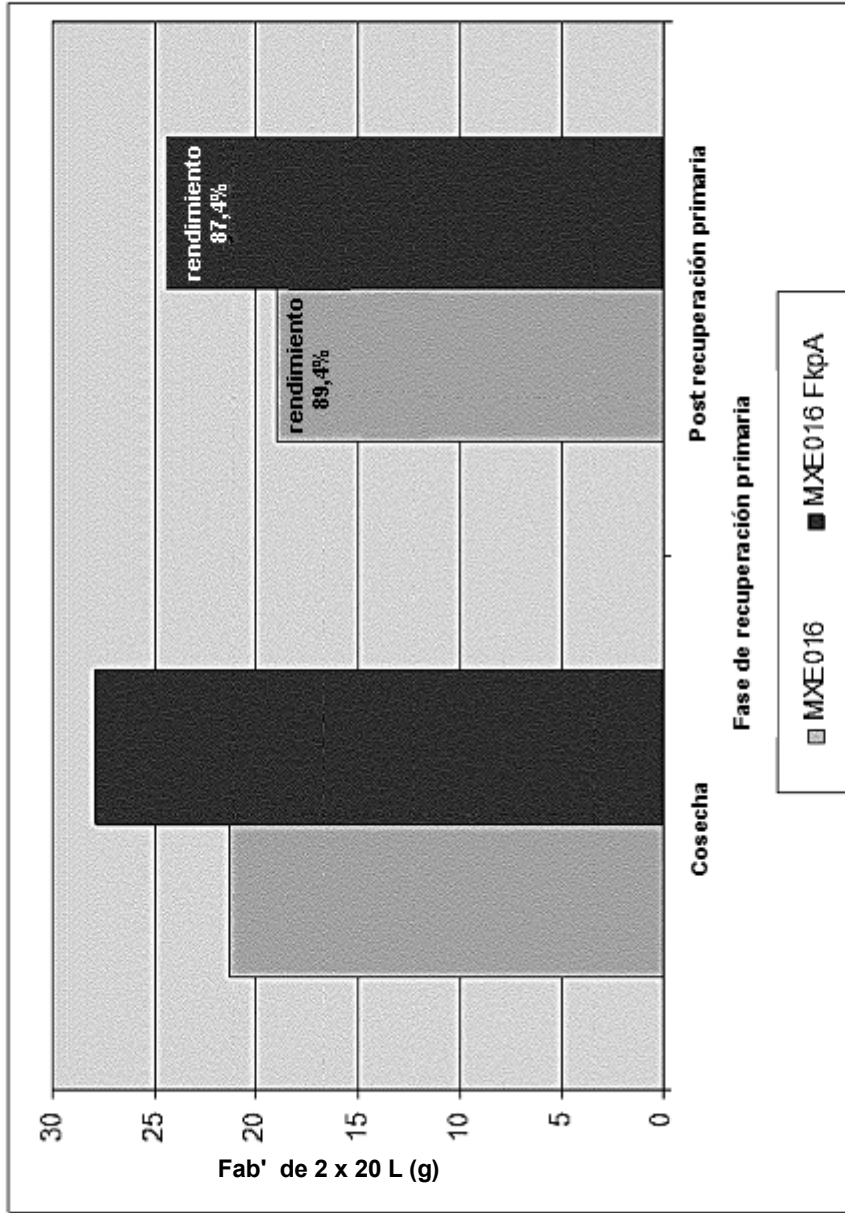
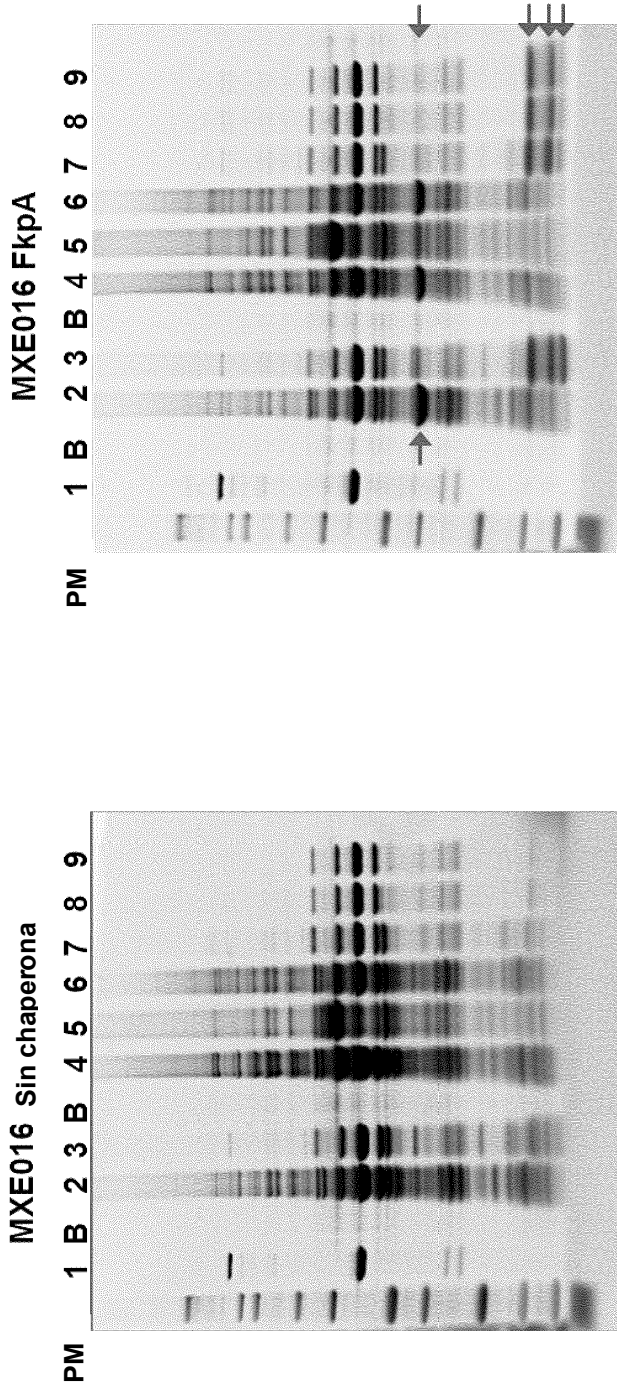
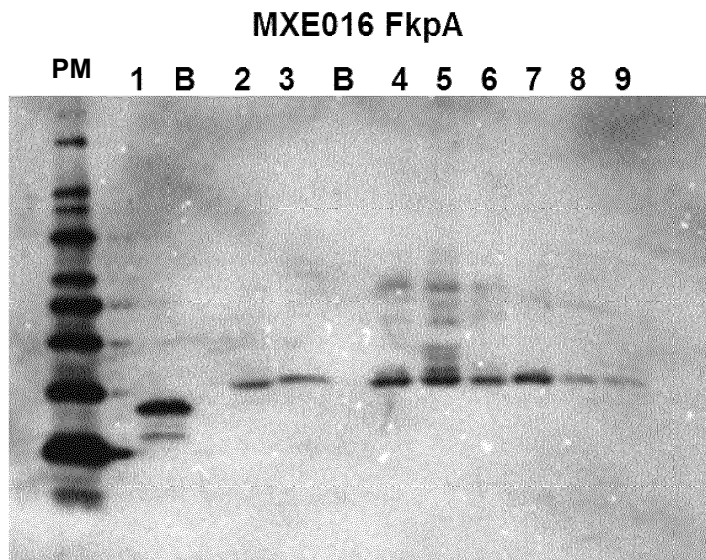


Figura 5 Recuperación primaria de lote de 20 litros ejecutada en gel teñido de SDS-PAGE en condiciones no reductoras



- 1 - Patrón X Fab';
- 2 - Extracto pequeña escala 30°C;
- 3 - Extracto pequeña escala 60°C;
- 4 - Sobrenadante de fase pesada;
- 5 - Fase ligera;
- 6 - Post adición de tampón;
- 7 - Post extracción;
- 8 - Post centrifugación del extracto;
- 9 - Post filtración

Figura 6 Transferencia Western en condiciones no reductoras para un lote a escala piloto de 20 L



- 1 – Control positivo etiqueta His (DsbC)
- 2 – Extracto pequeña escala 30°C
- 3 – Extracto pequeña escala 60°C
- 4 – Sobrenadante de fase pesada
- 5 – Fase ligera
- 6 – Post adición de tampón
- 7 – Post extracción
- 8 – Post centrifugación del extracto
- 9 – Post filtración

Figura 7A Mutación en diversos genes

ptr tipo salvaje (proteasa III) 5' (SEQ ID NO 81 y 82)

```

* 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
    
```

ptr Δ mutada (proteasa III) 5' (SEQ ID NO 79 y 80)

```

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 7B

Tsp tipo salvaje 5' (SEQ ID NO 75 y 76)

```

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

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

Tsp Δ mutada 5' (SEQ ID NO 77 y 78)

```

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 7C

DegP tipo salvaje

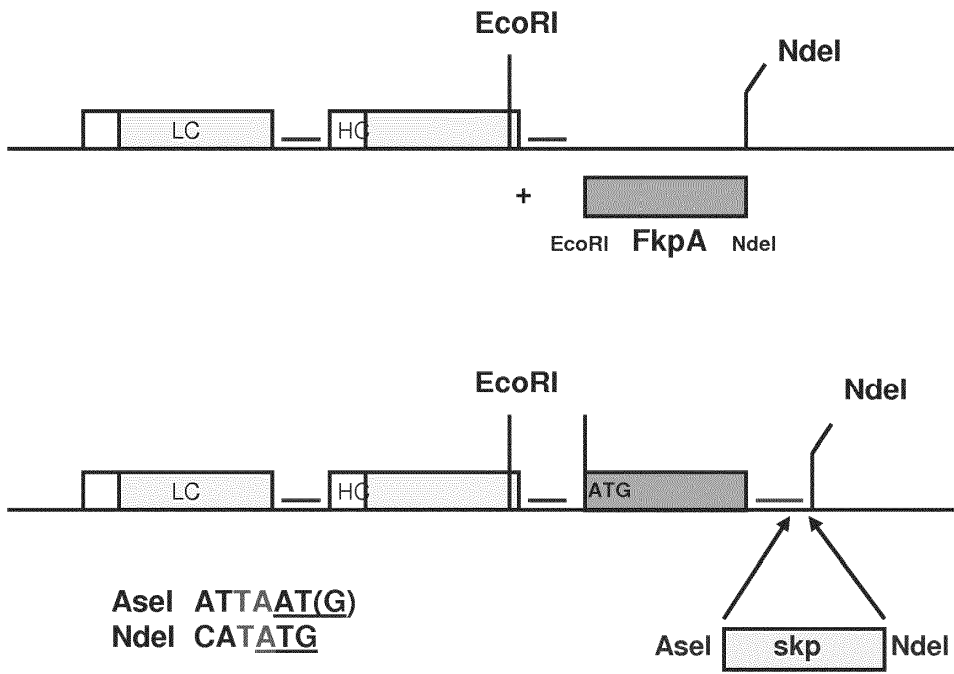
202 D A A I N R G N **S** G G
 949 GAT GCA GCG ATC AAC CGT GGT AAC **TCC** GGT GGT

DegP mutada 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 7D Inserción de genes



**FIGURA 8A** SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN del gen Tsp de tipo salvaje incluyendo los nucleótidos ATGAAC aguas arriba del codón de inicio

ATGAACATGTTTTTTAGGCTTACC CGGTAGCTGGCCTGCTTGCAATAGCAGGCCAGACCTTCGCTGTAGAA  
 GATATCACGCGTGCTGATCAAATTCGGTATTTAAAGGAAGAGACGCAGCATGCGACGGTAAGTGAGCGCGTA  
 ACGTCGCGCTTACCCGTTCTCATTATCGCCAGTTCGACCTCGATCAGGCATTTTCGGCCAAAATCTTTGAC  
 CGCTACCTGAATCTGCTCGATTACAGCCACAACGTGCTGCTGGCAAGCGATGTTGAACAGTTCGGGAAAAAG  
 AAAACCGAGTTAGGCGATGAACTGCGTTTCAGGCAAACCTCGACGTTTTCTACGATCTCTACAATCTGGCGCAA  
 AAGCGCCGTTTTGAGCGTTACCAGTACGCTTTGTTCGGTACTGGAAAAGCCGATGGATTTACCCGGCAACGAC  
 ACTTATAACCTTGACCCGAGCAAAGCGCCCTGGCCGAAAAACGAGGCTGAGTTGAACGCGCTGTGGGACAGT  
 AAAGTCAAATTCGACGAGTTAAGCCTGAAGCTGACAGGAAAAACGGATAAAAGAAATTCGTGAAACCCCTGACT  
 CGCCGCTACAAATTTGCCATTCGTCGCTGCGCGCAAACCAACAGCGAAGATGTTTTCTCGCTGGCAATGACG  
 GCGTTTTGCGCGTGAAATCGACCCGCATACCAACTATCTTTCCCGCGTAATACCGAACAGTTCAACACTGAA  
 ATGAGTTTTGTCGCTGGAAGGTATTGGCGCAGTGTGCAAAATGGATGATGACTACCCGTTATCAATTCGATG  
 GTGGCAGGTGTTCCGGCAGCGAAGAGTAAAGCTATCAGCGTTGGTGACAAAAATGTCGGTGTGGTCAAACA  
 GGCAAGCCGATGGTTGACGTGATTGGCTGGCGTCTTGATGATGTGGTTGCCTTAATTAAGGGCCGAAGGGC  
 AGTAAAGTTCGCTGGAATTTTACCTGCTGGTAAAGGGACCAAGACCCGTAAGTAAAGTTCGCTGAAACCCGTA  
 CGTATTCGCTCGAAGACCCGCGGTTAAAATGTCGGTGAAGACCGTCCGTAAGAGAAAGTTCGGCGTGTG  
 GATATTCGGGCTTCTATGTGGGTTGACAGACGATGTCAAAGTGCAACTGCAGAAACTGGAAAAACAGAAT  
 GTCAGCAGCGTCATCATCGACCTGCGTAGCAATGGCGGTGGGGCGTAACTGAAGCCGATCGCTCTCCGGT  
 CTGTTTTATCTCGGGTCCCATTGTTTCAGGTCCGCGATAACAACGGCAAGGTTTCGTAAGATAGCGATACC  
 GACGGACAGTTTTCTATAAAGGCCCGCTGGTGGTGTGGTTGACCGCTTCAGTGTTCGGCTTCAGAAATC  
 TTTGCCGCGGCAATGCAGGATTACGGTTCGTCGCTGGTTGTGGGTGAACCGACGTTTGGTAAAGGCACCGTT  
 CAGCAATACCGTTTCAATGAACCGTATTTACGATCAGATGTTACGTCCTGAATGGCCAGCGCTGGGTTCTGTG  
 CAGTACAGCATCCAGAAATCTATCGCGTTAACGGCGGACGATCGCAACGTAAGGCGTAACGCCAGACATC  
 ATCATGCCGACGGTAAATGAAGAAACGGAAACGGGTGAGAAATTCGAAGATAACCGCTGCCGTGGGATAGC  
 ATTGATGCCGCGACTTATGTGAAATCAGGAGATTTAACGGCCTTTGAACCGGAGCTGCTGAAGGAACATAAT  
 GCGCGTATCGCGAAAGATCCTGAGTTCAGAACATCATGAAGGATATCGCGCGCTTCAACGCTATGAAGGAC  
 AAGCGCAATATCGTTTTCTCTGAATTACGCTGTGCGTGAGAAAGAGAATAATGAAGATGATGCGACGCGTCTG  
 GCGCGTTTTGAACGAACGCTTTAAACGCGAAGGTAAACCGGAGTTGAAGAAACTGGATGATCTACCGAAAGAT  
 TACCAGGAGCCGATCCTTATCTGGATGAGACGGTGAATATCGCACTCGATCTGGCGAAGCTTGA AAAAGCC  
 AGACCCGCGGAACAACCCGCTCCCGTCAAGTAA

**FIGURA 8B** SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Tsp de tipo salvaje

MFFRLTALAGLLAIAGQTFAVEDITRADQIPVLKEETQHATVSRVTSRFRTRSHYRQFDLDQAFSAKIFDRY  
 LNLLDYSHNVLLASDVEQFAKKKTELGDDELRSGLDVFYDLYNLAQKRRFERYQYALSVLEKPMDFGTGNDTY  
 NLDKSKAPWPKNEAELNALWDSKVKFDELSLKLTKTDKEIRETLTRRYKFAIRRLAQTNSEDFVSLAMTAF  
 AREIDPHTNYLSPRNTEQFNTEMSLSLEGI GAVLQMDDDYTVINSMVAGGPAAKSKAISVGDKIVGVGQTGK  
 PMVDVIGWRLDDVVALIKGPKGSKVRLEILPAGKGTKTRTVTLTRERIRLEDRAVKMSVKTVGKEKVGVLDI  
 PGFYVGLTDDVKVQLQKLEKQNVSSVIIDLRSNGGGALTEAVLSGLFIPAGPIVQVRDNNKQVREDSDTDG  
 QVFKYKPLVVLVDRFSASASEIFAAMQDYGRALVVEPTFGKGTVQQYRSLNRIYDQMLRPEWPALGVSQY  
 TIQKFYRVNGGSTQRKGVTPDIIMPTGNEETETGEKFEFNALPWDSIDAATYVKSGLDTAFPELLEKHNR  
 IAKDPEFQNMKDIARFNAMKDKRNIVSLNYAVREKENNEDDATRLARLNERFKREGKPELKKLDDLKPKDYQ  
 EPDPYLDETVNIALDLAKLEKARPAEQPAPVK\*

**FIGURA 8C**

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ADN del gen Tsp desactivado mutado incluyendo los nucleótidos ATGAAC aguas arriba del codón de inicio

ATGAATTCGTTTTTAGGCTTACCGCGTTAGCTGGCCTGCTTGCAATAGCAGGCCAGACATTAATTGTAGAAG  
 ATATCACCGCGTGCTGATCAAATTCGGGTATTAAGGAAGAGACGCAGCATGCGACGGTAAGTGAGCCGTTAA  
 CGTTCGCGCTTCAACCGTTCTCATTATCGCCAGTTCGACCTCGATCAGGCATTTTCGGCCAAAATCTTTGACC  
 GCTACCTGAATCTGCTCGATTACAGCCACAACGTGCTGCTGGCAAGCGATGTTGAACAGTTCGCGAAAAAGA  
 AAACCGAGTTAGGCGATGAACTGCGTTCAGGCAAACCTCGACGTTTTCTACGATCTCTACAATCTGGCGCAAA  
 AGCGCCGTTTTGAGCGTTACCACTACGCTTTGTGCGTACTGGAAAAGCCGATGGATTTACCCGGCAACGACA  
 CTTATAACCTTGACCGCAGCAAAGCGCCCTGGCCGAAAAACGAGGCTGAGTTGAACGCGCTGTGGGACAGTA  
 AAGTCAAATTCGACGAGTTAAGCCTGAAGCTGACAGGAAAAACGGATAAAGAAATTCGTGAAACCCCTGACTC  
 GCCGCTACAAAATTTGCCATTCGTGCTGCTGGCGCAAACCAACAGCGAAGATGTTTTCTCGCTGGCAATGACGG  
 CGTTTTGCGCGTGAAATCGACCCGCATACCAACTCTTTCCCGCGTAATACCGAACAGTTCAACACTCCGAAA  
 TGAGTTTGTGCGCTGGAAGGTATTGGCGCAGTGTGCAAATGGATGATGACTACACCGTTATCAATTCGATGG  
 TGGCAGGTGGTCCGGCAGCGAAGAGTAAAGCTATCAGCGTTGGTGACAAAATTTGTCGGTGTGGTCAAACAG  
 GCAAGCCGATGGTTGACGTGATGGCTGGCGTCTGATGATGTGGTTGCCTTAATTAAGGGCCGAAGGGCA  
 GTAAAGTTCGTCTGGAATTTTACCTGCTGGTAAAGGGACCAAGACCCGTAAGTAAAGCTTGACCCGTGAAC  
 GTATTCGTCCTCGAAGACCGCGCGGTTAAAATGTCGGTGAAGACCGTCGGTAAAGAGAAAAGTCGGCGTCTGG  
 ATATTCGGGCTTCTATGTGGTGTGACAGACGATGTCAAAGTGCAACTGCAGAACTGGAAAAACAGAAATG  
 TCAGCAGCGTCATCATCGACCTGCGTAGCAATGGCGGTGGGGCGTTAACTGAAGCCGTATCGCTCTCCGGTC  
 TGTTTATTCCTGCGGGTCCCATTGTTTCCAGGTCCCGGATAACAACGGCAAGGTTGCTGAAGATAGCGATACCG  
 ACGGACAGGTTTTCTATAAAGGCCGCTGGTGGTGTGGTTGACCGCTTCAGTGCTTCGGCTTCAGAAATCT  
 TTGCCGCGCAATGCAGGATTACGGTCTGCGCTGGTTGTGGGTGAACCGACGTTTGGTAAAGGCACCGTTC  
 AGCAATACCGTTCATTGAACCGTATTTACGATCAGATGTTACGTCTGAAATGGCCAGCGCTGGGTTCTGTGC  
 AGTACACGATCCAGAAATTCATTCGCGTTAACGGCGCAGTACGCAACGTAAGGGCTAACGCCAGACATCA  
 TCATGCCGACGGTAAATGAAGAAACGGAAACGGGTGAGAAATTCGAAGATAACCGCGCTGCCGTGGGATAGCA  
 TTGATGCCGCGACTTATGTGAAATCAGGAGATTTAACCGCCTTTGAACCGGAGCTGCTGAAGGAACATAATG  
 CGCGTATCGCGAAAGATCCTGAGTTCAGAACATCATGAAGGATATCGCGCGCTTCAACGCTATGAAGGACA  
 AGCGCAATATCGTTTCTCTGAATTACGCTGTGCGTGAGAAAGAGAATAATGAAGATGATGCGACGCGTCTGG  
 CGGTTTTGAACGAACGCTTTAAACCGCAAGGTAACCGGAGTTGAAGAACTGGATGATCTACCGAAAGATT  
 ACCAGGAGCCGGATCCTTATCTGGATGAGACGGTGAATATCGCACTCGATCTGGCGAAGCTTGAAAAAGCCA  
 GACCCGCGGAACAACCCGCTCCCGTCAAGTAA

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ADN del gen de Proteasa III de tipo salvaje

ATGCCCCGACGACCTGGTTCAAAGCATTATTGTTGTAGTTGCCCTTTGGGCACCCCTTAAGTCAGGCAGAA  
 ACGGGATGGCAGCCGATTACAGGAAACCATCCGTAAAAGTGATAAAGATAAACCAGGATACAGGCTATACGT  
 CTGGATAACGGTATGGTGGTCTTGCTGGTTTCTGATCCGAGGCAGTTAAATCGCTCTCGGCGCTGGTGGTG  
 CCCGTTGGGTGCTGGAAGATCCCGAGGCGTACCAGGGGCTGGCACATTACCTTGAACATATGAGTCTGATG  
 GGGTCGAAAAAGTACCCGACGGCTGACAGTCTGGCCGAATATCTCAAATGCACGGCGGTAGTCACAATGCC  
 AGCACTGCGCCGTATCGCACGGCTTTCTATCTGGAAGTTGAGAACGACGCCTTGCCGTGGTGCAGGACCGC  
 CTGGCCGATGCTATTGCTGAACCTTTGCTCGACAAGAAATATGCCGAACTGAGCGTAATGCGGTGAACGCT  
 GAATTAACCATGGCGCGTACGCGTACGGGATGCGCATGGCACAGGTCAGCGCAGAAACCATTAACCCGGCA  
 CACCCCGGTTCAAAGTTTTCTGGTGGTAACCTCGAAACTTTAAGCGACAAACCTGGTAATCCGGTGCAGCAG  
 GCGCTGAAAGATTTCCACGAGAAGTACTATCCGCCAATTTGATGAAGGCGGTTATTTACAGTAATAAACCG  
 CTGCCGAGTTGGCAAAAATGGCGCGGACACCTTTGGTTCGCTGCGCAACAAAGAGAGCAAAAAACCGGAA  
 ATCACCGTGCAGGATGACCGACGCGCAAAAGGGCATTATCATTACGTCCTGCGCTGCCGCGTAAA  
 GTGTTGCGCGTTGAGTTTCGCATCGATAACAACCTCAGCGAAGTTCCGTAGTAAAACCGATGAATTGATTACC  
 TATCTGATTGGCAATCCGAGCCAGGTACACTTTCTGACTGGCTGCAAAAGCAGGGATAGTTGAGGGCATT  
 AGCGCAACTCCGATCCTATCGTCAACGGCAACAGCGCGTATTAGCGATCTCTGCGTCTTAACCGATAAAA  
 GGCCTGGCTAATCGCGATCAGGTTGTGGCGCAATTTTTAGCTATCTCAATCTGTTACGTGAAAAAGGCATT

**FIGURA 8C continuación**

GATAACAATACTTCGATGAACTGGCGAATGTGCTGGATATCGACTTCCGTTATCCGTCGATCACCCTGAT  
 ATGGATTACGTCGAATGGCTGGCAGATACCATGATTCGCGTTCCTGTTGAGCATAACGCTGGATGCAGTCAAT  
 ATTGCCGATCGGTACGATGCTAAAGCAGTAAAGGAACGCTTGGCGATGATGACGCCGAGAATGCGCGTATC  
 TGGTATATCAGCCGAAAGAGCCGCACAACAAAACGGCTTACTTTGTCGATGCGCCGTATCAGGTCGATAAA  
 ATCAGCGCACAAACTTTTCGCCGACTGGCAGAAAAAGCCGCCGACATTGCGCTCTCTTTGCCAGAGCTTAAC  
 CCTTATATTCCTGATGATTTCTCGCTGATTAAGTCAGAGAAGAAATACGACCATCCAGAGCTGATTGTTGAT  
 GAGTCGAATCTGCGCGTGGTGTATGCGCCAAGCCGTTATTTTCCAGCGAGCCAAAGCTGATGTCAGCCTG  
 ATTTTGCCTAATCCGAAAGCCATGGACAGCGCCCGCAATCAGGTGATGTTTTCGCTCAATGATTATCTCGCA  
 GGGCTGGCGCTTGATCAGTTAAGCAACCAGGCGTCCGTTGGTGGCATAAGTTTTTCCACCAACGCTAAACAAC  
 GGCCTTATGGTTAATGCTAATGGTTACACCCAGCGTCTGCCGAGCTGTTCCAGGCATTGCTCGAGGGGTAC  
 TTTAGCTATACCGCTACGGAAGATCAGCTTGAGCAGGCGAAGTCTGGTATAACCAGATGATGGATCCGCA  
 GAAAAGGGTAAAGCGTTTGGCAGGCGATTATGCCCGCCGAGATGCTCTCGCAAGTGCCGTACTTCTCGCGA  
 GATGAACGGCGTAAAAATTTGCCCTCCATTACGTTGAAAGAGGTGCTGGCCTATCGCGACGCCTTAAAAATCA  
 GGGGCTCGACCAGAGTTTATGGTTATCGGCAACATGACCGAGGCCAGGCAACAACGCTGGCAGCGGATGTG  
 CAAAAACAGTTGGGCGCTGATGGTTCAGAGTGGTGTGCAAAACAAGATGTAGTGGTCGATAAAAAACAATCC  
 GTCATCTTTGAAAAAGCCGGTAACAGCACCGACTCCGCACTGGCAGCGGTATTGTACCGACTGGCTACGAT  
 GAATACACCAGCTCAGCCTATAGCTCTCTGTTGGGGCAGATCGTACAGCCGTGGTCTACAATCAGTTGCGT  
 ACCGAAGAACAATTGGGCTATGCCGTGTTTGCCTTCCAATGAGCGTGGGGCGTCAGTGGGGCATGGGCTTC  
 CTTTTGCAAAGCAATGATAAACAGCCTTCATTTCTGTGGGAGCGTTACAAGGCGTTTTTCCCAACCGCAGAG  
 GCAAAATTGCGAGCGATGAAGCCAGATGAGTTTGCGCAATCCAGCAGGCGTAATTACCCAGATGCTGCAG  
 GCACCGCAAACGCTCGGCGAAGAAGCATCGAAGTTAAGTAAAGATTCGATCGCGGCAATATGCGCTTCGAT  
 TCGCGTGATAAAATCGTGGCCAGATAAAACTGCTGACGCCGAAAAACTTGCTGATTTCTTCCATCAGGCG  
 GTGGTCGAGCCGCAAGGCATGGCTATCTGTGCGAGATTTCCGGCAGCCAGAACGGGAAAGCCGAATATGTA  
 CACCCTGAAGGCTGGAAAGTGTGGGAGAACGTCAGCGCCTTGCAGCAAACAATGCCCTGATGAGTGAAAAG  
 AATGAGTGA

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Proteasa III de tipo salvaje

MPRSTWFKALLLLVALWAPLSQAETGWQPIQETIRKSDKDNRYQAIIRLDNGMVLLVSDPQAVKSLSALVV  
 PVGSLEDPEAYQGLAHYLEHMSLMGSKKYPQADSLAEYLKMHGGSHNASTAPYRTAFYLEVENDALPGAVDR  
 LADAI AEPLLDKKYAERERNAVNAELTMARTRDGMMAQVSAETINPAHPGSKFSGGNLETLSDKPGNFVQQ  
 ALKDFHEKYYSANLMKAVIYSNKPLPELAKMAADTFGRVPNKESKKPEITVPVVTDAQKGI I IHYPALPRK  
 VLRVEFRIDNNSAKFRSKTDELITYLIGNRSPGTLSDWLQKQGLVEGISANS DPIVNGNSGLAISASLTDK  
 GLANRDQVVAATFSYLNLLREKGI DKQYFDELANVL DDFRYPSITRDMDYVEWLADTMIRVPVEHTLDAVN  
 IADRYDAKAVKERLAMMTPQNARIWYISPKEPHNKTAYFVDAPYQVDKISAQTFADWQKKAADIALSLPELN  
 PYIPDDFSLIKSEKKYDHEPELIVDESNLRVVYAPSRYFASEPKADVSLILRNPKAMDSARNQVMFALNDYLA  
 GLALDQLSNQASVGGI SFSTNANGLMVNANGYTQRLPQLFQALLEGYFSYTATEDQLEQAKSWYNQMMDSA  
 EKGKAFEQAIMPAQMLSQVPYFSRDERRKILPSITLKEVLAYRDALKSGARPEFMVIGNMTEAQTTLARDV  
 QKQLGADGSEWCRNKDVVVDKQSVIFEKAGNSTDSALAAVFPVPTGYDEYTSAYSSLLGQIVQPFYFNQLR  
 TEEQLGYAVFAFPMSVGRQWGMGFLLSNDKQPSFLWERYKAFFPTAEAKLRAMKPDEFAQIQAVITQMLQ  
 APQTLGEEASKLSKDFDRGNMRFDSRDKIVAQIKLLTPQKLADFFHQAVVEPQMAILS QISGSQNGKAEYV  
 HPEGWKVWENVSALQQTMPLMSEKNE\*



**FIGURA 8D**

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN de un gen de Proteasa III desactivado mutado

ATTCCCCGCAGCACCTGGTTCAAAGCATTATTGTTGTTAGTTGCCCTTTGGGCACATTAATGTCAGGCAGAA  
 ACGGGATGGCAGCCGATTCCAGAAACCATCCGTAAAAGTGATAAAGATAACCGCCAGTATCAGGCTATACGT  
 CTGGATAACGGTATGGTGGTCTTGCTGGTTTCTGATCCGCAGGCAGTTAAATCGCTCTCGGCGTGGTGGT  
 CCCGTTGGGTCGCTGGAAGATCCCAGGGCTACCAGGGGCTGGCACATTACCTTGAACATATGAGTCTGATG  
 GGGTCGAAAAAGTACCCGCAGGCTGACAGTCTGGCCGAATATCTCAAATGCACGGCGGTAGTCACAATGCC  
 AGCACTGCGCCGTATCGCACGGCTTTCTATCTGGAAGTTGAGAACGACGCCTTGCCTGGTGCGGTAGACCGC  
 CTGGCCGATGCTATTGCTGAACCTTTGCTCGACAAGAAATATGCCGAACGTGAGCGTAATGCGGTGAACGCT  
 GAATTAACCATGGCGCGTACGCGTGACGGGATGCGCATGGCACAGGTCAGCGCAGAAACCATTAACCCGGCA  
 CACCCCGGTTCAAAGTTTTCTGGTGGTAACCTCGAAACTTTAAGCGACAAACCTGGTAATCCGGTGCAGCAG  
 GCGCTGAAAGATTTCCACGAGAAGTACTATTCCGCCAATTTGATGAAGGCGGTTATTTACAGTAATAAACCG  
 CTGCCGGAGTTGGCAAAAATGGCGGGGACACCTTTGGTTCGCGTGCCGAACAAAGAGAGCAAAAAACCGGAA  
 ATCACCGTGCCGGTAGTCACCGACGCGCAAAAGGGCATTATCATTCATTACGTCCCTGCGCTGCCGCGTAAA  
 GTGTTGCGCGTTGAGTTTCGCATCGATAACAACCTCAGCGAAGTTCCGTAGTAAAACCGATGAATTGATTACC  
 TATCTGATTGGCAATCGCAGCCAGGTACACTTTCTGACTGGCTGCAAAAGCAGGGATTAGTTGAGGGCATT  
 AGCGCCAACCTCGGATCCTATCGTCAACGGCAACAGCGGGGTATTAGCGATCTCTGCGCTTTTAAACCGATAAA  
 GGCCTGGCTAATCGCGATCAGGTTGTGGCGGCAATTTTTAGCTATCTCAATCTGTTACGTGAAAAAGGCATT  
 GATAACAATACTTCGATGAACTGGCGAATGTGCTGGATAATCGACTTCCGTTATCCGTGATCACCCGTGAT  
 ATGGATTACGTCGAATGGCTGGCAGATACCATGATTCGCGTTCCTGTTGAGCATAACGCTGGATGCAGTCAAT  
 ATTGCCGATCGGTACGATGCTAAAGCAGTAAAGGAACGTCCTGGCGATGATGACGCCGAGAAATGCCGCTATC  
 TGGTATATCAGCCGAAAGAGCCGCACAACAAAACGGCTTACTTTGTGATGCGCCGTATCAGGTCGATAAAA  
 ATCAGCGCACAAACTTTCCGCGACTGGCAGAAAAAGCCGCGACATTGCGCTCTCTTTGCCAGAGCTTAAC  
 CCTTATATTCCTGATGATTTCTCGCTGATTAAGTCAGAGAAGAAATACGACCATCCAGAGCTGATTTGTGAT  
 GAGTCGAATCTGCGCGTGGTGTATGCGCCAAGCCGTTAATTTGCCAGCGAGCCAAAGCTGATGTCAGCCTG  
 ATTTTGCCTAATCCGAAAGCCATGGACAGCGCCCGCAATCAGGTGATGTTTGCCTCAATGATTAATCTCGCA  
 GGGCTGGCGCTTATCAGTTAAGCAACCAGGCGTCCGTTGGTGGCATAAGTTTTTCCACCAACGCTAACAC  
 GGCCTTATGGTTAATGCTAATGGTTACACCCAGCGTCTGCCGAGCTGTTCCAGGCATTGCTCGAGGGGTAC  
 TTTAGCTATACCGCTACGGAAGATCAGCTTGAGCAGGCGAAGTCTTGGTATAACCAGATGATGGATCCGCA  
 GAAAAGGTTAAAGCGTTTGGAGCAGGCGATTATGCCCGCGCAGATGCTCTCGCAAGTGCCGTACTTCTCGCGA  
 GATGAACGGCGTAAAATTTTGGCCCTCATTACGTTGAAAGAGGTGCTGGCCTATCGCGACGCCTTAAAATCA  
 GGGGCTCGACCAGAGTTTATGGTTATCGGCAACATGACCGAGGCCAGGCAACAACGCTGGCACGGCATGTG  
 CAAAAACAGTTGGGCGCTGATGGTTCAGAGTGGTGTGCAAAACAAAGATGTAGTGGTTCGATAAAAAACAATCC  
 GTCATCTTTGAAAAAGCCGGTAACAGCACCGACTCCGCACTGGCAGCGGTATTTGTACCGACTGGCTACGAT  
 GAATACACCAGCTCAGCCTATAGCTCTCTGTTGGGGCAGATCGTACAGCCGTGGTCTACAATCAGTTGCGT  
 ACCGAAGAACAATTTGGGCTATGCCGTGTTTGCCTTTCCAATGAGCGTGGGGCGTCAGTGGGGCATGGGCTTC  
 CTTTTGCAAAGCAATGATAAACAGCCTTCATTCTTGTGGGAGCGTTACAAGGCGTTTTTCCCAACCCGAGAG  
 GCAAAATTTGCGAGCGATGAAGCCAGATGAGTTTGCGCAATCCAGCAGGCGGTAATTACCCAGATGCTGCAG  
 GCACCGCAAACGCTCGGCGAAGAAGCATCGAAGTTAAGTAAAGATTTTCGATCGCGGCAATATGCGCTTCGAT  
 TCGCGTGATAAAATCGTGGCCAGATAAAAACCTGCTGACCCGCAAAAACCTTGCTGATTTCTTCCATCAGGCG  
 GTGGTTCGAGCCGCAAGGCATGGCTATTTCTGTGCGAGATTTCCGGCAGCCAGAACGGGAAAGCCGAATATGTA  
 CACCCTGAAGGCTGGAAGTGTGGGAGAACGTGACGCGCTGACGCAACAATGCCCTGATGAGTAAAAG  
 AATGAGTGA

**FIGURA 8E**

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN de un gen DegP de tipo salvaje

ATGAAAAAACACATTAGCACTGAGTGCAGTGGCTCTGAGTTTAGGTTTGGCGTTATCTCCGCTCTCTGCA  
 ACGGCGGCTGAGACTTCTTCAGCAACGACAGCCCAGCAGATGCCAAGCCTTGCAACCGATGCTCGAAAAGGTG  
 ATGCCTTCAGTGGTCAAGCATTAACTAGAAAGGTAGCACAACCGTTAATACGCCGCGTATGCCGCGTAATTTT  
 CAGCAGTCTTCGGTGTATGATTCTCCGTTCTGCCAGGAAGTTCTCCGTTCCAGAGCTCTCCGTTCTGCCAG  
 GGTGGCCAGGGCGGTAATGGTGGCGGCCAGCAACAGAAATTCATGGCGCTGGGTCCGCGGTCATCATTGAT  
 GCCGATAAAGGCTATGTCGTCACCAACAACCACGTTGTTGATAACGCGACGGTCATTAAGTTCAACTGAGC  
 GATGGCCGTAAGTTCGACGCGAAGATGGTTGGCAAAGATCCGCGCTCTGATATCGCGCTGATCCAAATCCAG  
 AACCCGAAAAACCTGACCGCAATTAAGATGGCGGATTCTGATGCACTGCGCGTGGGTGATTACACCGTAGCG  
 ATTGGTAACCCGTTTGGTCTGGGCGAGACGGTAACCTCCGGGATTGTCTCTGCGCTGGGGCGTAGCGGCCTG  
 AATGCCGAAAACCTACGAAAACCTTCATCCAGACCGATGCAGCGATCAACCGTGGTAACTCCGGTGGTGCCTG  
 GTTAACCTGAACGGCGAACTGATCGGTATCAACACCGCGATCCTCGCACCGGACGGCGGCAACATCGGTATC  
 GGTTCGCTATCCCGAGTAACATGGTGA AAAACCTGACCTCGCAGATGGTGGAAATACGGCCAGGTGAAACGC  
 GGTGAGCTGGGTATTATGGGGACTGAGCTGAACTCCGAACTGGCGAAAGCGATGAAAGTTGACGCCAGCGC  
 GGTGCTTTTCGTAAGCCAGGTTCTGCCTAATTCCTCCGCTGCAAAGCGGGCATTAAAGCGGGTGTATGTGATC  
 ACCTCACTGAACGGTAAGCCGATCAGCAGCTTTGCCGCACTGCGTGCTCAGGTGGGTACTATGCCGTTAGGC  
 AGCAAACCTGACCCTGGGCTTACTGCGCGACGGTAAGCAGGTTAACGTGAACCTGGAACCTGCAGCAGAGCAGC  
 CAGAATCAGGTTGATTCCAGCTCCATCTTCAACGGCATTGAAGGCGCTGAGATGAGCAACAAAGGCAAAGAT  
 CAGGGCGTGGTAGTGAACAACGTGAAAACGGGCACCTCCGGCTGCGCAGATCGGCCTGAAGAAAGGTGATGTG  
 ATTATTGGCGCGAACAGCAGGCAGTGA AAAACATCGCTGAACTGCGTAAAGTTCTCGACAGCAAACCGTCT  
 GTGCTGGCACTCAACATTACAGCGCGCGACAGCACCATCTACCTGTTAATGCAGTAA

Figura 8: es la secuencia de aminoácidos de DegP de tipo salvaje

MKKTTLALSALALSGLLALSPLSATAAETSATTAQQMPSLAPMLEKVMPSVVS INVEGSTTVNTPRMPRNF  
 QQFFGDDSPFCQEGSPFQSSPFCQGGQGGNGGQQQKFMALGSGVIIDADKGYVVTNNHVVDNATVILKVQLS  
 DGRKFDKVMVGDPRSDIALIQINPKNLTAIKMADSDALRVGDYTVAIIGNPFGLGETVTSIVSALGRSGL  
 NAENYENFIQTDAAINRNGSSGALVNLNGELIGINTALAPDGGNIGIGFAIPSNMVKNLTSQMVEYGVQVCR  
 GELGIMGTELNSELAKAMKVDAQRGAFVSVQVLPNSSAAKAGIKAGDVI TSLNGKPISSFAALRAQVGTMPVG  
 SKLTLGLLRDQKQVNVNLELQSSQNVDS SSI FNGIEGAEMSNKGDQGVVNVNKTGT PAAQIGLKKGDV  
 IIGANQAVKNIAELRKLVDLSDKPSVLALNIQRGDSTIYLLMQ

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

ATGAAAAAACACATTAGCACTGAGTGCAGTGGCTCTGAGTTTAGGTTTGGCGTTATCTCCGCTCTCTGCA  
 ACGGCGGCTGAGACTTCTTCAGCAACGACAGCCCAGCAGATGCCAAGCCTTGCAACCGATGCTCGAAAAGGTG  
 ATGCCTTCAGTGGTCAAGCATTAACTAGAAAGGTAGCACAACCGTTAATACGCCGCGTATGCCGCGTAATTTT  
 CAGCAGTCTTCGGTGTATGATTCTCCGTTCTGCCAGGAAGTTCTCCGTTCCAGAGCTCTCCGTTCTGCCAG  
 GGTGGCCAGGGCGGTAATGGTGGCGGCCAGCAACAGAAATTCATGGCGCTGGGTCCGCGGTCATCATTGAT  
 GCCGATAAAGGCTATGTCGTCACCAACAACCACGTTGTTGATAACGCGACGGTCATTAAGTTCAACTGAGC  
 GATGGCCGTAAGTTCGACGCGAAGATGGTTGGCAAAGATCCGCGCTCTGATATCGCGCTGATCCAAATCCAG  
 AACCCGAAAAACCTGACCGCAATTAAGATGGCGGATTCTGATGCACTGCGCGTGGGTGATTACACCGTAGCG  
 ATTGGTAACCCGTTTGGTCTGGGCGAGACGGTAACCTCCGGGATTGTCTCTGCGCTGGGGCGTAGCGGCCTG  
 AATGCCGAAAACCTACGAAAACCTTCATCCAGACCGATGCAGCGATTAATCGTGGTAACGCCGGTGGTGCCTG  
 GTTAACCTGAACGGCGAACTGATCGGTATCAACACCGCGATCCTCGCACCGGACGGCGGCAACATCGGTATC  
 GGTTCGCTATCCCGAGTAACATGGTGA AAAACCTGACCTCGCAGATGGTGGAAATACGGCCAGGTGAAACGC  
 GGTGAGCTGGGTATTATGGGGACTGAGCTGAACTCCGAACTGGCGAAAGCGATGAAAGTTGACGCCAGCGC  
 GGTGCTTTTCGTAAGCCAGGTTCTGCCTAATTCCTCCGCTGCAAAGCGGGCATTAAAGCGGGTGTATGTGATC  
 ACCTCACTGAACGGTAAGCCGATCAGCAGCTTTGCCGCACTGCGTGCTCAGGTGGGTACTATGCCGTTAGGC  
 AGCAAACCTGACCCTGGGCTTACTGCGCGACGGTAAGCAGGTTAACGTGAACCTGGAACCTGCAGCAGAGCAGC  
 CAGAATCAGGTTGATCCAGTCCATCTTCAACGGCATTGAAGGCGCTGAGATGAGCAACAAAGGCAAAGAT  
 CAGGGCGTGGTAGTGAACAACGTGAAAACGGGCACCTCCGGCTGCGCAGATCGGCCTGAAGAAAGGTGATGTG  
 ATTATTGGCGCGAACAGCAGGCAGTGA AAAACATCGCTGAACTGCGTAAAGTTCTCGACAGCAAACCGTCT  
 GTGCTGGCACTCAACATTACAGCGCGCGACAGCACCATCTACCTGTTAATGCAGTAA

**FIGURA 8F**

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de una proteína DegP mutada

MKKTLLALSALALSGLALSPLSATAAETSSATTAQQMPSLAPMLEKVMPSVVSINVEGSTTVNTPRMPRNF  
 QQFFGDDS PFCQEGSPFQSSPFCQGGQGGNGGGQQQKFMALGSGVIIDADKGYVVTNNHVVDNATVIKQLS  
 DGRKFDKAMVGDPRSDIALIQIQNPKNLTAIKMADSDALRVGDYTVAIIGNPFGLGETVTSIVSALGRSGL  
 NAENYENFIQTDAAINRGNAGGALVNLNGELIGINTAILAPDGGNIGIGFAIPSNMVKNLTSQMVEYGVKR  
 GELGIMGTELNSELAKAMKVDAQRGAFVSVQLPNSSAAKAGIKAGDVITSLNGKPISSFAALRAQVGTMPVG  
 SKLTLGLLRDQKQVNVNLELQQSSQNQVDSSIFNGIEGAEMSNKGDQGVVVNNVKTGTCAAQIGLKKGDV  
 IIGANQQAVKNIAELRKVLDSKPSVLALNIQRGDSTIYLLMQ

SEQ ID NO: 11 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

CTGCCTGCGATTTTCGCCGGAACG

SEQ ID NO: 12 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

CGCATGGTACGTGCCACGATATCC

SEQ ID NO: 13 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

GGGAAATGAACCTGAGCAAAACGC

SEQ ID NO: 14 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen de Proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

GGGAAAGGCGCGGAACCGCCTAG

SEQ ID NO: 15 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen de Proteasa III mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

CTACTGTGCCAGCGGTGGTAATGG

SEQ ID NO: 16 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.

GCATCATAATTTCTTTTACCTC

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de ADN del gen spr de tipo salvaje

TCTGCATGTAGTGCAAATAACACCGCAAAGAATATGCATCCTGAGACACGTGCAGTGGGTAGTGAACATCA  
 TCACTGCAAGCTTCTCAGGATGAATTTGAAAACCTGGTTCGTAATGTCGACGTAATAATCGCGAATTATGGAT  
 CAGTATGCTGACTGGAAAGCGTACGTTATCGTCTGGGCGGCAGCACTAAAAAGGTATCGATTGTTCTGGT  
 TTCGTACAGCGTACATTCGGTGAGCAATTTGGCTTAGAACTCCGCGTTCGACTTACGAACAGCAGGAAATG  
 GGTAAATCTGTTTCCCGCAGTAATTTGCGTACGGGTGATTTAGTTCTGTTCCGTGCCGGTTCAACGGGACGC  
 CATGTCGGTATTTATATCGGCAACAATCAGTTTGCCATGCTTCCACCAGCAGTGGTGTATTATTTCCAGC  
 ATGAATGAACCGTACTGGAAGAAGCGTTACAACGAAGCACGCCGGTTCTCAGCCGCAGC

**FIGURA 8G**

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos del gen spr de tipo salvaje incluyendo la secuencia señal que consiste en los primeros 26 residuos de aminoácido

MVKSQPILRYILRGIPAI AVAVLLSACSANNTAKNMHPETRAVGSETSSLQASQDEFENLVRNVDVKSRI MD  
QYADWKGVRYRLGGSTKKGIDCSGFVQRTFREQFGLLEPRSTYEQQEMGKSVSRSNLRTGDLVLFragSTGR  
HVGIIYIGNNQFVHASTSSGVI I SSMNEPYWKKRYNEARRVLSRS

SEQ ID NO: 19 es el gen spr no mutado sin la secuencia señal

CSANNTAKNMHPETRAVGSETSSLQASQDEFENLVRNVDVKSRI MDQYADWKGVRYRLGGSTKKGIDCSGFV  
QRTFREQFGLLEPRSTYEQQEMGKSVSRSNLRTGDLVLFragSTGRHVGIIYIGNNQFVHASTSSGVI I SSMN  
EPYWKKRYNEARRVLSRS

SEQ ID NO: 20 una secuencia OmpT mutada que comprende las mutaciones D210A y H212A

ATGCGGGCGAAACTTCTGGGAATAGTCCTGACAACCCCTATTGCGATCAGCTCTTTTGCTTCTACCGAGACT  
TTATCGTTTACTCCTGACAACATAAAATGCGGACATTAGTCTTGGA ACTCTGAGCGGAAAAACAAAAGAGCGT  
GTTTATCTAGCCGAAGAAGGAGGCCGAAAAGTCAGTCAACTCGACTGGA AATTCAATAACGCTGCAATTATT  
AAAGGTGCAATTAATTGGGATTTGATGCCCCAGATATCTATCGGGGCTGCTGGCTGGACA ACTCTCGGCAGC  
CGAGGTGGCAATATGGTCGATCAGGACTGGATGGATTCCAGTAACCCCGGAACCTGGACGGATGAAAGTAGA  
CACCTGATACACA ACTCAATTATGCCAACGAATTTGATCTGAATATCAAAGGCTGGCTCCTCAACGAACCC  
AATTACCGCTGGGACTCATGGCCGGATATCAGGAAAGCCGTTATAGCTTTACAGCCAGAGGTGGTTCCTAT  
ATCTACAGTTCTGAGGAGGGATTCAGAGATGATATCGGCTCCTTCCGAATGGAGAAAGAGCAATCGGCTAC  
AAACAACGTTTAAAATGCCCTACATTGGCTTGACTGGAAGTTATCGTTATGAAGATTTTGA ACTCGGTGGC  
ACATTTAAATACAGCGGCTGGGTGGAATCATCTGATAACGCTGAAGCTTATGACCCGGGAAAAAGAATCACT  
TATCGCAGTAAGGTCAAAGACCAAAATTACTATTCTGTTGCAGTCAATGCAGGTTATTACGTCACACCTAAC  
GCAAAAGTTTATGTTGAAGGCCATGGAATCGGTTACGAATAAAAAAGGTAATACTTCACTTTATGATCAC  
AATAATAACTTTCAGACTACAGCAAAAATGGAGCAGGTATAGAAA ACTATAACTTCATCACTACTGCTGGT  
CTTAAGTACACATTTTAA

SEQ ID NO: 21 una secuencia OmpT mutada que comprende las mutaciones D210A y H212A

MRAKLLGIVLTTPIAIISSFASTETLSFTPDNINADISLGLTSGKTKERVYLAEEGGKRVSQLDWKFNNAAII  
KGAINWDLMPQISIGAAGWTTLGSRGGNMVDQDWDSSNPGTWTDESRHPDTQLNYANEFDLNKGWLLNEP  
NYRLGLMAGYQESRYSFTRAGGSYIYSSEEGFRDDIGSFPNGERAI GYKQRFKMPYIGLTGSYRYEDFELGG  
TFKYSGWVESD NAEAYDPGRKITYRSKVKDQNYYSVAVNAGYYVTPNAKVYVEGAWNRVTNKKGNTSLYDH  
NNNTSDYSKNGAGIENYNFITTAGLKYTF

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia OmpT desactivada mutada

ATTGCGGGCGAAACTTCTGGGAATAGTCCTGACAACCCCTATTGCGATCAGCTCTTTTGCTTCTACCGAGACT  
TTATCGTTTACTCCTGACAACATAAAATGCGGACATTAGTCTTGGA ACTCTGAGCGGAAAAACAAAAGAGCGT  
GTTTATCTAGCCGAAGAAGGAGGCCGAAAAGTCAGTCAACTCGACTGGA AATTCAATAACGCTGCAATTATT  
AAAGGTGCAATTAATTGGGATTTGATGCCCCAGATATCTATCGGGGCTGCTGGCTGGACA ACTCTCGGCAGC  
CGAGGTGGCAATATGGTCGATCAGGACTGGATGGATTCCAGTAACCCCGGAACCTGGACGGATGAAAGTAGA  
CACCTGATACACA ACTCAATTATGCCAACGAATTTGATCTGAATATCAAAGGCTGGCTCCTCAACGAACCC  
AATTACCGCTGGGACTCATGGCCGGATATCAGGAAAGCCGTTATAGCTTTACAGCCAGAGGTGGTTCCTAT  
ATCTACAGTTCTGAGGAGGGATTCAGAGATGATATCGGCTCCTTCCGAATGGAGAAAGAGCAATCGGCTAC  
AAACAACGTTTAAAATGCCCTACATTGGCTTGACTGGAAGTTATCGTTATGAAGATTTTGA ACTCGGTGGC  
ACATTTAAATACAGCGGCTGGGTGGAATCATCTGATAACGATGAACACTATGACCCGGGAAAAAGAATCACT  
TATCGCAGTAAGGTCAAAGACCAAAATTACTATTCTGTTGCAGTCAATGCAGGTTATTACGTCACACCTAAC  
GCAAAAGTTTATGTTGAAGGCCATGGAATCGGTTACGAATAAAAAAGGTAATACTTCACTTTATGATCAC  
AATAATAACTTTCAGACTACAGCAAAAATGGAGCAGGTATAGAAA ACTATAACTTCATCACTACTGCTGGT  
CTTAAGTACACATTTTAA

**FIGURA 8H**

SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia del adaptador oligonucleotídico OmpA

CGATTGAATGGAGA<sup>ACTTGAATTCGGGCGAAACTTCTGGGAATAG</sup>

SEQ ID NO: 24 muestra un casete que codifica la secuencia intergénica 1 (IGS1) para la expresión de Fab en E. coli

AAGTTTTAATAGAGGAGAGTGTAAATGAAG<sup>AAG</sup>

SEQ ID NO: 25 muestra el casete oligonucleotídico que codifica la secuencia intergénica 2 (IGS2) para la expresión de Fab en E. coli

AAGTTTTAATAGAGGGGAGTGTAAAATGAAGAAG

SEQ ID NO: 26 muestra un casete que codifica la secuencia intergénica 3 (IGS3) para la expresión de Fab en E. coli

AAGCTTTAATAGAGGAGAGTGTGAGGAGGAAAAAATGAAGAAA

SEQ ID NO: 27 muestra un casete que codifica la secuencia intergénica 4 (IGS4) para la expresión de Fab en E. coli

AAGCTTTAATAGAGGAGAGTGTGACGAGGATTATATAATGAAGAAA

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de ADN del gen FkpA de tipo salvaje

ATGAAATCACTGTTTAAAGTAA<sup>CGCTGCTGGCGACCAACAATGGCCGTTGCCCTGCATGCACCAATCACTTTT</sup>  
 GCTGCTGAAGCTGCAAAACCTGCTACAGCTGCTGACAGCAAAGCAGCGTTCAAAAATGACGATCAGAAATCA  
 GCTTATGCACTGGGTGCCTCGCTGGGTGCTTACATGGAAAACCTCTCTAAAAGAACAAGAAAACTGGGCATC  
 AAAGTGGATAAAGATCAGCTGATCGCTGGTGTTCAGGATGCATTTGCTGATAAGAGCAAACCTCTCCGACCAA  
 GAGATCGAACAGACTCTACAAGCATTGAAAGCTCGCGTGAAGTCTTCTGCTCAGGCGAAGATGGAAAAAGAC  
 GCGGCTGATAACGAAGCAAAAGGTAAAGAGTACC GCGAGAAATTTGCCAAAGAGAAAGGTGTGAAAACCTCT  
 TCAACTGGTCTGGTTTATCAGGTAGTAGAAGCCGGTAAAGGCGAAGCACCGAAAGACAGCGATACTGTTGTA  
 GTGAACTACAAAGGTACGCTGATCGACGGTAAAGAGTTCGACAACCTTTACACCCGTGGTGAACCGCTTTCT  
 TTCCGTCTGGACGGTGTATCCCGGGTTGGACAGAAGGTCTGAAGAACATCAAGAAAGCGGTAAGATCAAAA  
 CTGGTTATTCACACAGAAGTGGCTTACGGCAAAGCGGGTGTCCGGGGATCCACCGAATCTACCCTGGTG  
 TTTGACGTAGAGCTGCTGGATGTGAAACCAGCGCCGAAGGCTGATGCAAAGCCGGAAGCTGATGCGAAAGCC  
 GCAGATTC<sup>TGCTAAAAAA</sup>

SEQ ID NO: 29 es la secuencia de proteínas del gen FkpA de tipo salvaje

MKSLFKVTL<sup>LATTMAVALHAPI</sup>TFAAEAAKPATAADSKAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGI  
 KLDKDLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTS  
 STGLVYQVVEAGKEAPKDS<sup>DTVVVNYKGTLL</sup>DGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVI<sup>PGWTEGLKNIKKGKIK</sup>  
 LVIPPELAYGKAGVPGIPPNSTLVFDVLELLDVKPAKADAKPEADAKAADS<sup>AKK</sup>

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de ADN del gen FkpA etiquetado con his

ATGAAATCACTGTTTAAAGTAA<sup>CGCTGCTGGCGACCAACAATGGCCGTTGCCCTGCACGCACCAATCACTTTT</sup>  
 GCTGCTGAAGCTGCAAAACCTGCTACTGCTGCTGACAGCAAAGCAGCGTTCAAAAATGACGATCAGAAATCA  
 GCTTATGCACTGGGTGCCTCGCTGGGTGCTTACATGGAAAACCTCTCTAAAAGAACAAGAAAACTGGGCATC  
 AAAGTGGATAAAGATCAACTGATCGCTGGTGTTCAGGATGCATTTGCTGATAAGAGCAAACCTCTCCGACCAA  
 GAGATCGAACAGACTCTACAAGCATTGAAAGCTCGCGTGAAGTCTTCTGCTCAGGCGAAGATGGAAAAAGAC  
 GCGGCTGATAACGAAGCAAAAGGTAAAGAGTACC GCGAGAAATTTGCCAAAGAGAAAGGTGTGAAAACCTCT  
 TCAACTGGTCTGGTTTATCAGGTAGTAGAAGCCGGTAAAGGCGAAGCACCGAAAGACAGCGATACTGTTGTA  
 GTGAACTACAAAGGTACGCTGATCGACGGTAAAGAGTTCGACAACCTTTACACCCGTGGTGAACCGCTTTCT  
 TTCCGTCTGGACGGTGTATCCCGGGTTGGACAGAAGGTCTGAAGAACATCAAGAAAGCGGTAAGATAAAA  
 CTGGTTATTCACACAGAAGTGGCTTACGGCAAAGCGGGTGTCCGGGGATCCACCAATCTACCCTGGTG  
 TTTGACGTAGAGCTGCTGGATGTGAAACCAGCGCCGAAGGCTGATGCAAAGCCGGAAGCTGATGCGAAAGCC  
 GCAGATTC<sup>TGCTAAAAAACACCATCACCATCACCAC</sup>

**FIGURA 8I**

SEQ ID NO: 31 es la secuencia de proteínas del gen etiquetado con his FkpA

MKSLFKVTL LAT TMAVALHAPITFAAEAAKPATAADSKAAAFKNDDQKSAYALGASLG RYMENSLKEQEKLGI  
 KLDKDKQLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTS  
 STGLVYQVVEAGKGEAPKDSDTVVVNYKGTLDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGKIK  
 LVIPPELAYGKAGVPGI PPNSTLVFDVELLDVVKPAPKADAKPEADAKAADS AKKHHHHHHH

SEQ ID NO: 32 es la secuencia de ADN del gen skp de tipo salvaje

GTGAAAAAGTGGTTATTAGCTGCAGGTCTCGGTTTAGCACTGGCAACTTCTGCTCAGGCGGCTGACAAAATT  
 GCAATCGTCAACATGGGCAGCCTGTTCCAGCAGGTAGCGCAGAAAACCGGTGTTCTAACACGCTGGAAAAT  
 GAGTTCAAAGGCCGTGCCAGCGAACTGCAGCGTATGGAAACCGATCTGCAGGCTAAAATGAAAAAGCTGCAG  
 TCCATGAAAGCGGGCAGCGATCGCACTAAGCTGGAAAAAGACGTGATGGCTCAGCGCCAGACTTTTGCTCAG  
 AAAGCGCAGGCTTTTGAGCAGGATCGCGCACGTGTTCCAACGAAGAACGCGGCAAACCTGGTTACTCGTATC  
 CAGACTGCTGTGAAATCCGTTGCCAACAGCCAGGATATCGATCTGGTTGTTGATGCAAACGCCGTTGCTTAC  
 AACAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTGCCGACGTACTGAAACAGGTTAAATAA

SEQ ID NO: 33 es la secuencia de proteínas del gen skp de tipo salvaje

MKKWLLAAGLGLALATSAQAADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFKGRASELQRMETDLQAKMKKLQ  
 SMKAGSDR TKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFEQDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVDANAVAY  
 NSSDVKDITADVLKQVK

SEQ ID NO: 34 es la secuencia de ADN del gen skp etiquetado con his

ATGAAAAAGTGGTTATTAGCCGCAGGTCTCGGTTTAGCACTGGCAACTTCTGCTCAGGCGGCTGACAAAATT  
 GCAATCGTCAACATGGGCAGCCTGTTCCAGCAGGTAGCGCAGAAAACCGGTGTTCTAACACGCTGGAAAAT  
 GAGTTCAAAGGCCGTGCCAGCGAACTCCAGCGTATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAATGAAAAAGCTGCAA  
 TCCATGAAAGCGGGCAGCGATCGCACTAAGCTGGAAAAAGACGTGATGGCTCAGCGCCAGACTTTTGCTCAG  
 AAAGCGCAGGCTTTTGAGCAGGATCGCGCACGTGTTCCAACGAAGAACGCGGCAAACCTGGTTACTCGTATC  
 CAGACTGCTGTGAAATCCGTTGCCAACAGCCAGGAAATCGATCTGGTTGTTGATGCAAACGCCGTTGCTTAC  
 AACAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTGCCGACGTACTGAAACAGGTTAAACACCATCACCATCACCAC

SEQ ID NO: 35 es la secuencia de proteínas el gen skp etiquetado con his

MKKWLLAAGLGLALATSAQAADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFKGRASELQRMETDLQAKMKKLQ  
 SMKAGSDR TKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFEQDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQEIDLVDANAVAY  
 NSSDVKDITADVLKQVKHHHHHHH

**Secuencias Ab CA170\_1519**

- CDRH1  
 GFTFSNYGMV                      SEQ ID NO: 36
- CDRH2  
 YIDSDGDNITYRDSVKG            SEQ ID NO: 37
- CDRH3  
 GIVRPFLY                         SEQ ID NO: 38
- CDRL1  
 KSSQSLVGASGKTYLY             SEQ ID NO: 39
- CDRL2  
 LVSTLDS                         SEQ ID NO: 40
- CDRL3  
 LQGFHPHT                        SEQ ID NO: 41

**FIGURA 8J**

**Región VL de Ab 1519 de rata SEQ ID NO: 42**

DVVMTQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQSRGQSPK RLIYLVSTLD  
SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLQGTHFP HTFGAGTKLE LK

**Región VL de Ab 1519 de rata SEQ ID NO: 43**

gatgttgatga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc  
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg  
ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctgggtgc cacactggac  
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc  
cgagagtgga aagccgatga tttgggagtt tattaactgct tgcaaggtag acattttcct  
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

**Región VL de Ab 1519 de rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 44**

*MMSPAQFLFLLMLWIQGTSGDVVMTQTPLSLSVALGQPASISCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQSRGQSPK*  
RLIYLVSTLD SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLQGTHFP HTFGAGTKLE LK

**Región VL de Ab 1519 de rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 45**

*atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ctgatgctct ggattcaggg aaccagtggt*  
gatgttgatga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc  
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg  
ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctgggtgc cacactggac  
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc  
cgagagtgga aagccgatga tttgggagtt tattaactgct tgcaaggtag acattttcct  
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

**Región VH de Ab 1519 de rata SEQ ID NO: 46**

EVPLVESGGG SVQPGRSMKL SCVVS<sup>u</sup>GFTFS NYGMVWVRQA PKKGLEWVAY IDSDGDNTYY  
RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTTGI VRPFLYWGQG TTVTVS

**Región VH de Ab 1519 de rata SEQ ID NO: 47**

gaggtgccgc tggaggagtc tggggggcgc tcagtgcagc ctggggaggtc catgaaactc  
tcctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tggctctgggt ccgccaggct  
ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcataat attgattctg atgggtgataa tacttactac  
cgagattccg tgaagggccg attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat  
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggcactt attactgtac aacagggatt  
gtccggccct ttctctattg gggccaagga accacggtag ccgtctcg

**Región VH de Ab 1519 de rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 48**

*MDISLSLAFV VLFVKVRCF* VPLVESGGGS VQPGRSMKLS CVVS<sup>u</sup>GFTFSN YGMVWVRQAP  
KKGLEWVAYI DSDGDNTYYR DSVKGRFTIS RNNAKSTLYL QMDSLRSED TATYYCTTGI  
RPFYWGQGT TTVTVS

**Región VH de Ab 1519 de rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 49**

*atggacatca gtctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaaggtgt ccggtgtgag*  
gtgccgctgg tggagtctgg gggcggctca gtgcagcctg ggaggtccat gaaactctcc  
tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtccg ccaggctcca  
aagaagggtc tggagtgggt cgcataatatt gattctgatg gtgataatac ttactaccga  
gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaaataatg caaaaagcac cctatatattg  
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggattgtc  
cggccctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcaccg tctcgc

**FIGURA 8K**

Región V gL20 1519 SEQ ID NO: 50

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD  
SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP HTFGQGTKLE IK

Región V gL20 1519 SEQ ID NO: 51

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggoga tcgtgtgact  
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaaccta cctgtactgg  
ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat  
agcggatttc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt  
agctccctcc agccggagga ctttgcctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg  
cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaa

Región V gL20 1519 SEQ ID NO: 51 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 52

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQKPGKAPKRLIYLVSTLDSGIPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQGTHFPHTFGQGTKLEIK

Región V gL20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 53

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgc  
gctgatatcc agatgaccca gactccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg  
actattacct gtaaaagctc ccagtcctcg gtgggtgcaa ggggcaaac ctacctgtac  
tggtctttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg  
gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc  
attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt  
ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaa

Cadena ligera gL20 1519 (V + constante) SEQ ID NO: 54

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD  
SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP HTFGQGTKLE IKRTVAAPSV  
FIFFPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNAL SGNSQESVTE QDSKDYSTYS  
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

Cadena ligera gL20 1519 (V + constante) SEQ ID NO: 55

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggoga tcgtgtgact  
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaaccta cctgtactgg  
ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat  
agcggatttc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt  
agctccctcc agccggagga ctttgcctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg  
cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc  
ttcatcttcc cgcatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg  
ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa  
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc  
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa  
gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagag ggagtg

Cadena ligera gL20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 56

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDRT TITCKSSQSL VGASGKTYLY  
WLFQKPGKAP KRLIYLVSTL DSGIPSRFSG SGSGTEFTLT ISSLQPEDFA TYCLQGTHF  
PHTFGQGTKL EIKRTVAAPS VFIFFPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL  
QSGNSQESVT EQDSKDYSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC



**FIGURA 8L**

**Cadena ligera gL20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 57**

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa  
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg  
actattacct gtaaaagctc ccagtcacct gtgggtgcaa gcggcaaac ctacctgtac  
tggtctttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg  
gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc  
attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt  
ccgcacactt tccgcccaggg taccaaactg gaaatcaaac gtacggtagc ggccccatct  
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc  
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc  
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc  
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgctgc  
gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt

**Región V gH20 1519 SEQ ID NO: 58**

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY IDSDGDNTYY  
RDSVKGRFTI SRDPAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI VRPFLYWGQ TLVTVS

**Región V gH20 1519 SEQ ID NO: 59**

gaggttccgc tggctcagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc  
tcttgtgcag tatctggctt cacgttctcc aactacggtg tgggtgtgggt tcgtcaggct  
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactccg acggcgacaa cacctactat  
cgcgactctg tgaaggtcgc cttcaccatt tcccgcgata acgcaaatac cagcctgtac  
ctgcagatga acagcctcgc tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc  
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcg

**Región V gH20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 60**

MKKTALAIAV ALAGFATVAQ AEVPLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF SNYGMVWVRQ  
APKGLEWVA YIDSDGDNTY YRDSVKGRFT ISRDNKSSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTTG  
IVRPFLYWGQ GTLVTVS

**Región V gH20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 61**

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gctgtagctg gtttcgccac cgtagcgcaa  
gctgagggtt cgctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt  
ctctcttctg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatgggtgtg ggttcgtcag  
gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac  
tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcaa atccagcctg  
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg caccactggc  
atcgtgcgctc cgtttctgta ttggggctcag ggtaccctcg ttactgtctc g

**Cadena pesada Fab' gH20 1519 (V + CH1 gamma 1 humana + bisagra) SEQ ID NO: 62**

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY IDSDGDNTYY  
RDSVKGRFTI SRDPAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI VRPFLYWGQ TLVTVSSAST  
KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY  
SLSSVTVVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTC

**FIGURA 8M**

**Cadena pesada Fab' gH20 1519 (V + CH1 gamma 1 humana + bisagra) SEQ ID NO: 63**

gaggttccgc tggctcgatc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc  
 tcttgtgcag tatctggctt cacgttctcc aactacggtg tgggtgggt tcgtcaggct  
 ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgat attgactccg acggcgacaa cacctactat  
 cgcgactctg tgaaggtcgt cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac  
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcgggtg actattgcac cactggcatc  
 qtgcgtccgt ttctgtattg gqgtcagggg accctcgtta ctgtctcag cgttctaca  
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca  
 ggcgacctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggctgtcc tacagtcctc aggactctac  
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc  
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgacaaga aagttgagcc caaatcttgt  
 gacaaaactc acacatgcgc cgcg

**Cadena pesada Fab' gH20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 64**

MKKTAIAI<sup>IAV</sup> ALAGFATVAQ AEVPLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF SNYGMVWVRQ APGKGLEWVA  
 YIDSDGNTY YRDSVKGRFT ISRDNKSSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTTG IVRPFLYWGQ GTLVTVSSAS  
 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKHTTCAA

**Cadena pesada Fab' gH20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 65**

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa  
gctgagggttc cgctgggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt  
 ctctcttctg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatgggtg ggttcgtcag  
 gctccaggta aaggtctgga atgggtggog tatattgact ccgacggcga caacacctac  
 tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccggg ataacgcaa atccagcctg  
 tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgactattg caccactggc  
 atcgtgcgtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagegcttct  
 acaaagggcc catcggtctt ccccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca  
 gcggccctg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac  
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggctg tctacagtc ctcaggactc  
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggctcgaca agaaagttga gcccaaatct  
 tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg

**Cadena pesada IgG4 gH20 1519 (V + constante gamma 4P humana) SEQ ID NO: 66**

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY IDSDGNTYY  
 RDSVKGRFTI SRDNKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI VRPFLYWGQG TLVTVSSAST  
 KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY  
 SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV  
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV  
 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF  
 SCSVMHEALH NHYTQKLSLSL SLGK

FIGURA 8N

Cadena pesada IgG4 gH20 1519 (V + constante gamma 4P humana, exones subrayados) SEQ ID NO: 67

gaggtagcacttgtggaaagcggaggaggtcttgtgcagcctggaggaaagtttacgtctctcttgtgctgtgtctggctt  
caccttctccaattacggaatggtctgggtcagacaagcacctggaaagggcttgaatgggtggcctatatattgactctg  
acggggacaacacctactatcgggattccgtgaaagagccttcacaatctcccgagataacgccaagagctcactgtac  
ctgcagatgaaatagcctgagagccgaggatactgccgtgtaactattgcacaacgggaatcgtaggccttttctgtactg  
gggacagggcaccttggttactgtctcagcgccttctacaaaagggccatccgtcttccccctggcgccctgctccagga  
gcacctccgagagcacagccgcccctgggtgctgctgtaagagacttccccgaaccggtgacggtgctgctggaactca  
ggcgccctgaccagcggcgtgacacacttccccggtgctctacagtcctcaggactctactccccagcagcgtggtgac  
cgtgcccctccagcagcttgggacgaagacctacacctgcacaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttggtga  
gaggccagcacagggaggagggtgtctgctggaagccaggtcagccctcctgctggaagcaccggtgtgacgacc  
ccagcccagggcagcaagcagcctcctgtctcctcaccggagcctctgaccaccccactcatgcccagggagag  
ggtcttctggatttttccaccaggtcctggcagccacaggtggaatgcccctaccccagccctgcgcatacaggggca  
ggtgtcgcgctcagacctgccaagagccatataccgggagaccctgcccctgacctaaagcccaccccaaggccaaactc  
tccactccccagctcagacaccttctctcctcccagatctgagtaactcccaatcttctctctcagagtccaaatatg  
gtccccatgcccaccatgcccaggtaagcaaacccagcctgcctccagctcaaggcgggacaggtgcccctagagta  
gcctgcatccagggcagcccccagcgggtgctgacgcatccacctccatctcttccctcagcacctgagttcctggggg  
gacctcagcttctcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtg  
gtggcgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcaataatgccaagacaaa  
gcccggggaggagcagttcaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaaccaggactggctgaacggca  
aggagtacaagtgaaggctctccaacaaaagcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaaagccaaaaggtggacc  
cacgggtgctgagggccacatggacagaggtcagctcgcccccacctctgcccctgggagtgaccgctgtgccaacctctg  
tcccacagggcagcccagagagccacaggtgtacacctgccccatcccagggagatgaccaagaaccaggtcagc  
ctgacctgcccggcctcaaggcttctaccccagcgcacatcccggtggagtgaggagcaatgggcaagccggagacaacta  
caagaccagcctcccgtgctgactccgacggctccttctcctctacagcaggtaccaggtggacaagagcaggtggc  
aggaggggaaatgtcttctcctgctcctgctgctgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctcccctgtct  
ctgggtaaa

Cadena ligera FabFv gL20 1519 SEQ ID NO: 68

DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD  
 SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLOQGFHP HTFGQGKLE IKRTVAAPS  
 FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPRK VQWKVDNAL SGNSQESVTE QDSKDYSTL  
 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VIHQLSSPV TKSENRGECG GGGGSGGGGS GGGGSDIQMT  
 QSPSSVSASV GDRVTITCQS SPSVWSNFLS WYQKPGKAP KLLIYEASKL TSGVPSRFSG  
 SSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYYCGGYS ISDTTFGCGT KVEIKRT

Cadena ligera FabFv gL20 1519 SEQ ID NO: 69

gatatccaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttgggtga tccgctgaca  
 attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg gcaagacctt tctgtactgg  
 ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgct tacccttgac  
 tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt  
 tcatcgctgc aaccagagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttccct  
 cacactttcg gccaggggac aaaaactcga atcaaacgta cggtagcggc cccatctgct  
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa  
 tccggtaact cccagagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg  
 agcagcacc tgacgctgct taaagcagac tacgagaaac acaaagtgta cgctgagaa  
 gtcacccatc aggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc  
 ggtgcccgtg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc  
 cagagtcctt catcggatc cgcgtccgtt ggcgataggg tgactattac atgtcaagc  
 tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaaccggg gaaggtcca  
 aaacttctga tttatgaagc ctogaaactc accagtgag ttccgtcaag attcagtggc  
 tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgag  
 acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtgata cgacatttgg gtgaggtact  
 aaggtgaaa tcaaacgtac c

FIGURA 80

**Cadena ligera FabFv gL20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 70**

*MSVPTQVLGLLLLWLT*DARCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQKPKAPKRLIYLV  
STLDSGIPSRFSGSGSCTEFTLLTISLQPEDFATYYCLOQTHFPHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDVRTITCQSSPSVWSNFLSWYQKPKAPKLLI  
YEASKLTSVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGYSISDITFGCGTKVEIKRT

**Cadena ligera FabFv gL20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 71**

*atgtctgtccccaccaagt*cctcggactcctgctactctggcttacagatgccagatgcatatccagatg  
accagagcccatctagcttatccgcttccgcttggtgatcgcgtgacaattaagtgtgagagctcccaatct  
ctcgtgggtgcaagtggcaagacctatctgtaactgctcttccagaagcctggcaaggcaccacacacggctg  
atctatctggtgctacccttgactctgggataccgctcagatcttccggatctgggagcggaaactgagttc  
acactcacgatttcatcgcgtgcaaccggaggactttgctacctactactgacctgcaaggcactcatttccct  
cacacttccggccaggggacaaaactcgaatcaaacgtacggttagcggccccatctgtcttcatcttcccg  
ccatctgatgagcagttgaaactcggaaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagag  
gcccacagtcagtggaagtggaataacgcccctccaatcgggtaactccagggagagtgctcacagagcaggac  
agcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgacgctgtctaaagcagactacgagaaacacaaagt  
tacgctgcaagtacccatcaggcctgagctcaccagtaacaaaaagtttaataagaggggagtgtagc  
ggtggcgggtgcaagtggtggggaggctccggagtgccggttcagacatacaaatgaccagagtccttca  
tcggtatccgctcggcttgccgatagggtgactattacatgtcaagctctcctagcgtctggagcaatctt  
ctatcctggtatcaacagaaaccggggaaggctccaaaacttctgattatgaagcctcgaactcaccagt  
ggagttccgctcaagattcagtggtctggatcaggacagacttcaagttgacaatcagttcgtgcaacca  
gaggacttgcgacctactattgtggtggaggttacagtagcataagtgatacagacatttgggtgcggact  
aagggtgaaatcaaacgtacc

**Cadena pesada FabFv gH20 1519 SEQ ID NO: 72**

EVPLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMVWRQAPGKGLEWVAYIDSDGDNITYRDSVKGRFTISR  
DNAKSSLYLQMNLSRAEDTAVYYCTTGIVRPFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVE  
PKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI  
IWSGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

**Cadena pesada FabFv gH20 1519 SEQ ID NO: 73**

gaggtaaccacttgggaaagcggaggaggtcttctgagcagcctggaggaaagttacgtctctcttctgctgtg  
tctggcttccacttctccaattacggaatgggtctgggtcagacaagcactggaaaggggtctgaaatgggtg  
gcctatattgactctgacggggacaacacctactatcgggattccgtgaaaggacgcttcacaatctcccg  
gataacgccaaagagctcactgtacctgcagatgaatagcctgagagccgaggatactgccgtgactattgc  
acaacgggaatcgttaggccttctctgactggggacagggcaccttggttactgtctcgagcgcgctccaca  
aagggcccacgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcggcctgggctgc  
ctggtcaaggactacttccccgaaccagtgacggtgctcgtggaactcaggtgccctgaccagcggcgttcc  
acctccccgctgtcctacagctctcaggactctactcctgagcagcgtggtgacctgacctccagcagc  
ttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaaggtcgataagaaagttgag  
cccaaatctttagtgaggtggggctcaggtggaggcgggaccggtggaggtggcagcaggttcaactg  
cttgagctcggaggagcctagtcagcctggaggagcctgctctctcttctgagcagtaagcggcatcgac  
ctgagcaattacgccatcaactgggtgagacaagctccggggaagtggttagaatggatcgggtataatag  
gccaagtgaggacgacctttagctacatgggcgaaaggaaggtttacaattagccgggacaatagcaaaaac  
accgtgatctccaaatgaactccttgcgagcagaggaacagcggcgtgactattgtgctcgcactgtcca  
ggttatagcactgcaccctactcgtatctgtggggacaagggaccctggtgactgtttcaagt

**Cadena pesada FabFv gH20 1519 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 74**

*MEWSWVFLFFLSVT*TGVHSEVPLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMVWRQAPGKGLEWVAYIDS  
DGDNTIYRDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNLSRAEDTAVYYCTTGIVRPFYWGQGLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTY  
ICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYA  
INWVRQAPGKCLEWIGI IWSGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTA  
PYFDLWGQGLVTVSS