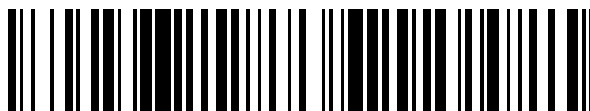


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 786**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10	(2006.01)	C12N 15/78	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 15/64	(2006.01)		
C12N 15/67	(2006.01)		
C12N 15/74	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C07H 21/04	(2006.01)		
C07K 14/57	(2006.01)		
C07K 14/61	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2005** **E 11176612 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2434016**

54 Título: **Expresión de proteínas de mamífero en Pseudomonas fluorescens**

30 Prioridad:

16.01.2004 US 537148 P
22.04.2004 US 564798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.04.2019

73 Titular/es:

PFENEX INC. (100.0%)
10790 Roselle Street
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

RETALLACK, DIANE, M.;
SQUIRES, CHARLES, H.;
WATKINS, DAVID, C.;
GAERTNER, FRANK, H.;
LEE, STACEY, LYNN y
SHUTTER, ROBERT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 707 786 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

Expresión de proteínas de mamífero en *Pseudomonas fluorescens*

Campo de la invención

5 La invención es un método para la producción mejorada de una proteína o péptido recombinante de mamífero, particularmente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por expresión en una célula huésped de Pseudomonad. El método mejora la producción de expresión de proteína de mamífero en sistemas de expresión conocidos.

Antecedentes de la invención

10 Más de 325 millones de personas en todo el mundo han recibido ayuda de los más de 155 medicamentos y vacunas biotecnológicos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos. Además, hay más de 370 productos biotecnológicos y vacunas actualmente en ensayos clínicos dirigidos a más de 200 enfermedades, incluidos varios cánceres, la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades cardíacas, la diabetes, la esclerosis múltiple, el SIDA y la artritis. A diferencia de las terapias tradicionales de moléculas pequeñas que se producen a través de la síntesis química clásica, las proteínas se producen generalmente en las células vivas de manera ineficiente y a un alto costo. Debido al alto costo y la complejidad, existe una falta de capacidad de
15 fabricación de medicamentos basados en proteínas.

20 El uso de células microbianas para producir productos tiene una historia muy larga. Ya en 1897, Buchner descubrió que las enzimas extraídas de la levadura son efectivas para convertir el azúcar en alcohol, lo que conduce a la producción de compuestos químicos industriales clave que usan microorganismos. En la década de 1940, se logró la producción a gran escala de penicilina a través de la fermentación. Las técnicas para la inserción de genes foráneos en bacterias se desarrollaron por primera vez a principios de los años setenta. La producción bacteriana de proteína recombinante de mamífero comercialmente viable se explotó primero en la producción de insulina humana (Goeddel, et al., 1979a; Wong, 1997). Hoy en día, la fermentación y el cultivo celular son la base de la producción industrial de alcohol, antibióticos, compuestos bioquímicos y proteínas terapéuticas. Sin embargo, el desarrollo y la fabricación de proteínas terapéuticamente útiles se ha visto obstaculizado debido, en gran parte, a las limitaciones de los
25 organismos actuales utilizados para expresar estas proteínas exógenas.

Expresión de proteína procariota frente a eucariota

30 Aunque el sistema de expresión bacteriano se usa a menudo para producir proteínas eucariotas recombinantes, típicamente las proteínas producidas difieren significativamente de sus contrapartidas originales. En general, es un desafío reproducir las estructuras eucariotas secundarias y terciarias en sistemas de expresión de *E. coli*. Al mismo tiempo, si bien los sistemas de expresión eucariotas actualmente son más capaces de formar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas eucariotas recombinantes, la capacidad de estos sistemas para producir proteínas recombinantes en gran cantidad es limitada.

35 Las modificaciones postraduccionales representan las diferencias más significativas entre la expresión de proteína procariota y eucariota. Los procariotas (es decir, las bacterias) tienen una estructura celular muy simple y no tienen organelos unidos a la membrana. En eucariotas, a menudo se modifica una proteína después de que se produce inicialmente. Estas modificaciones, en muchos casos, son necesarias para convertir el péptido en una forma funcional. Por lo tanto, incluso cuando los sistemas de expresión bacterianos existentes producen una proteína con la estructura primaria correcta, la proteína puede no ser modificada postraduccionalmente y, por lo tanto, a menudo no es funcional. Las modificaciones comunes incluyen formación de enlaces disulfuro, glicosilación, acetilación, acilación, fosforilación y gamma-carboxilación, todas las cuales pueden regular el plegamiento de proteínas y la actividad biológica. Los sistemas de expresión bacterianos generalmente no glicosilan, acetilan, acilan, fosforilan o gamma-carboxilan proteínas eucariotas apropiadamente.

45 Bacterias, tales como *E. coli*, puede formar enlaces disulfuro, pero los enlaces a menudo se forman en la configuración incorrecta requerida para la actividad biológica; por lo tanto, normalmente se requiere desnaturalización y replegamiento para producir proteínas eucariotas activas. Las proteínas chaperonas moleculares están presentes tanto en procariotas como en eucariotas que facilitan el plegamiento de otras proteínas. En ausencia de tales chaperonas, las cadenas polipeptídicas desplegadas o parcialmente plegadas son inestables dentro de la célula, frecuentemente se pliegan incorrectamente o se agregan en complejos insolubles. La unión de chaperonas estabiliza estos polipéptidos desplegados, evitando así el plegamiento o la agregación incorrectos y permitiendo que la cadena de polipéptidos se pliegue en su conformación correcta. Sin embargo, las chaperonas difieren en cada tipo de célula y pueden expresarse diferencialmente en función de las condiciones extracelulares.

Problemas con los sistemas de expresión actuales

55 *Escherichia coli* (*E. coli*) es el sistema de expresión de proteínas más amplia y rutinariamente utilizado. La producción en *E. coli* es económica, rápida y bien caracterizada. Además, es posible escalar y cosechar, y la producción de cGMP está bien establecida. Sin embargo, existen limitaciones significativas para el uso de *E. coli*,

que a menudo resultan difíciles de superar, particularmente cuando se expresan proteínas recombinantes de mamífero.

Junto con las limitaciones descritas anteriormente, la expresión de alto nivel de productos génicos recombinantes en *E. coli* a menudo da como resultado el mal plegamiento de la proteína de interés y su posterior degradación por proteasas celulares o depósito en agregados biológicamente inactivos conocidos como cuerpos de inclusión. La proteína que se encuentra en los cuerpos de inclusión generalmente se debe extraer y regenerar para recuperar su actividad, lo que agrega tiempo y dinero al proceso. Los métodos de renaturalización típicos implican intentos de disolver el agregado en desnaturalizante concentrado y la posterior eliminación del desnaturalizante por dilución. Algunos de los factores que se ha sugerido que están involucrados en la formación del cuerpo de inclusión incluyen la alta concentración local de proteína; un ambiente reductor en el citoplasma (el citoplasma de *E. coli* tiene un alto nivel de glutatión) que previene la formación de enlaces disulfuro; carece de modificaciones postraduccionales, que pueden aumentar la solubilidad de la proteína; interacciones inapropiadas con chaperonas y otras enzimas involucradas en el plegado *in vivo*; entrecruzamiento intermolecular a través de un enlace disulfuro u otros enlaces covalentes; y una mayor agregación de productos intermedios de plegamiento debido a su limitada solubilidad. Es probable que sea una combinación de estos factores, así como una disponibilidad limitada de chaperonas, que más comúnmente conducen a la formación de cuerpos de inclusión.

Los sistemas de expresión de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, también se usan comúnmente para producir proteínas. Estos sistemas están bien caracterizados, proporcionan buenos niveles de expresión y son relativamente rápidos y económicos en comparación con otros sistemas de expresión eucariotas. Sin embargo, la levadura puede realizar solo modificaciones proteicas postraduccionales limitadas, la proteína puede necesitar replegamiento, y la recolección de la proteína puede ser un problema debido a las características de la pared celular.

Los sistemas de expresión de células de insectos también han surgido como una alternativa atractiva, pero costosa, como un sistema de expresión de proteínas. A veces pueden producirse proteínas correctamente plegadas que generalmente están modificadas postraduccionales y se ha logrado la expresión extracelular. Sin embargo, no es tan rápido como las bacterias y las levaduras, y el aumento de escala generalmente es un desafío.

Los sistemas de expresión de células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, se usan a menudo para la expresión de proteínas complejas. Este sistema generalmente produce proteínas plegadas correctamente con las modificaciones postraduccionales apropiadas y las proteínas pueden expresarse extracelularmente. Sin embargo, el sistema es muy costoso, el escalamiento es lento y con frecuencia no es factible, y los rendimientos de proteína son más bajos que en cualquier otro sistema.

Pseudomonas fluorescens (*P. fluoresceins*)

Pseudomonas fluorescens abarca un grupo de saprófitos no patógenos comunes que colonizan el suelo, el agua y los entornos de la superficie de las plantas. *P. fluorescens* son ampliamente utilizados en procesos agrícolas e industriales, incluso comercialmente para la producción de proteínas industriales y agrícolas no mamíferas. Enzimas no mamíferas derivadas de *P. fluorescens* se han usado para reducir la contaminación ambiental, como aditivos detergentes y para la hidrólisis estereoselectiva. Mycogen comenzó a expresar proteínas bacterianas recombinantes en *P. fluorescens* a mediados de la década de 1980 y presentó su primera solicitud de patente sobre la expresión de la toxina *Bacillus thuringiensis* en *P. fluorescens* el 22 de enero de 1985 ("Cellular encapsulation of biological pesticides"). Entre 1985 y 2004, Mycogen, más tarde Dow Agro Sciences, así como otras compañías, capitalizaron el uso agrícola de *P. fluorescens* en solicitudes de patente sobre la producción de toxinas plaguicidas, insecticidas y nematocidas, así como sobre secuencias tóxicas específicas y manipulación genética para potenciar la expresión de estas. Ejemplos de solicitudes de patentes dirigidas a la expresión de proteínas bacterianas recombinantes en *P. fluorescens* incluyen: las patentes de Estados Unidos Nos. 3.844.893; 3,878,093; 4,169,010; 5.292.507; 5,558,862; 5,559,015; 5,610,044; 5,622,846; 5,643,774; 5,662,898; 5,677,127; 5,686,282; 3.844.893; 3,878,093; 4,169,010; 5,232,840; 5,292,507; 5,558,862; 5,559,015; 5,610,044; 5,622,846; 5,643,774; 5,662,898; 5,677,127; 5,686,282; 5,686,283; 5,698,425; 5,710,031; 5,728,574; 5,731,280; 5,741,663; 5,756,087; 5,766,926; 5,824,472; 5,869,038; 5,891,688; 5,952,208; 5,955,348; 6,051,383; 6,117,670; 6,184,440; 6,194,194; 6,268,549; 6,277,625; 6,329,172; 6,447,770; así como las publicaciones PCT Nos. WO 00/15761; WO 00/29604; WO 01/27258; WO 02/068660; WO 02/14551; WO 02/16940; WO 03/089455; WO 04/006657; WO 04/011628; WO 87/05937; WO 87/05938; WO 95/03395; WO 98/24919; WO 99/09834; y WO 99/53035.

El 8 de octubre de 2003, Dow AgroSciences presentó la publicación PCT No. 04/087864 titulada "Amended Recombinant Cells (ARCs) for the Production and Delivery of Antiviral Agents, Adjuvants and Vaccine Accelerants". La solicitud divulga células recombinantes que pueden incluir al menos un gen heterólogo que codifica una quimioquina o una citoquina y la administración de tales células a un huésped para acelerar una respuesta inmune. La aplicación demuestra la producción de interferón- α bovino e interferón- γ en *P. fluorescens*. Gubler et al., 1986, Arthur et al., 1990, Bellini et al., 1991 and Fleer et al., 1991 describir la producción de interleucina 1 α en diversos organismos huésped, específicamente *E. coli*, *B. subtilis* y *K. lactis*. FR 2 567540 divulga la producción de interferón- α 2 humano en una especie de *Pseudomonas* depositada. El documento US 2003/157069 describe el concepto de producir un ligando de Flt-3 en la célula huésped de *Pseudomonas*. Taub 2004 ofrece una descripción general de la

clasificación de las citoquinas, los factores de crecimiento y las quimioquinas, y el documento WO 2004/087864 describe las células huésped de *P. fluorescens* que expresan quimioquinas.

Actualmente, Dow Global Technologies tiene varias solicitudes de patentes pendientes en el área de uso de *P. fluorescens* para producir proteínas recombinantes. La solicitud PCT WO 03/068926 de Dow Global Technologies, presentada el 13 de febrero de 2003, titulada "Over-Expression of Extremozyme Genes in Pseudomonas and Closely Related Bacteria" describe un sistema de expresión en el que *Pseudomonas*, específicamente *P. fluorescens*, pueden usarse como células huésped para la producción de enzimas extremozimas. Estas enzimas son típicamente antiguas, se encuentran en procariotas, eucariotas que incluyen hongos, levaduras, líquenes, protistas y protozoos, algas y musgos, tardígrados y peces. La patente divulga que las enzimas pueden derivarse de ciertos hongos y levaduras extremófilos, pero típicamente se derivan de bacterias extremófilas.

La publicación PCT No. WO 03/089455 de Dow Global Technologies, presentada el 22 de abril de 2003, titulada "Low-Cost Production of Peptides" describe un método para producir péptidos pequeños, principalmente péptidos antimicrobianos, como precursores concatémicos en *Pseudomonas*, específicamente *P. fluorescens*.

La publicación PCT No. WO 04/005221 de Dow Global Technologies, titulada "Benzoate and Antranilate Inducible Promoters" proporciona nuevos promotores inducibles por benzoato o antranilato de *P. fluorescens*, así como nuevos promotores en tándem, variantes y mutantes mejorados de los mismos, que son útiles para sistemas de fermentación procariotas comerciales.

La patente de los Estados Unidos No. 5.232.840 de Monsanto Co. describe el uso de nuevos sitios de unión ribosómica para mejorar la expresión de ciertas proteínas en células procariotas. En un ejemplo, las células se usan para expresar la hormona de crecimiento porcina en varios organismos, incluido *E. coli*, *P. fluorescens*, y *P. putida*. Los datos muestran que *P. fluorescens* es menos eficiente para expresar la hormona de crecimiento cuando se compara con *E. coli*. Por el contrario, cuando expresa una proteína bacteriana, *P. fluorescens* es mucho más eficaz en la producción de proteínas que *E. coli* bajo condiciones comparables. De hecho, las células de *P. fluorescens* descritas en esta patente producen β -galactosidasa derivada de bacterias varias veces más que *E. coli* (comparar la tabla 4 con las tablas 1 y 2).

Mientras que se ha avanzado en la producción de proteínas de interés comercial, sigue existiendo una gran necesidad de mejorar la capacidad y el nivel de producción de las proteínas recombinantes de mamífero, y en particular de ser humano.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso para la producción de proteínas recombinantes de mamíferos, en particular humanas, que pueden aislarse y purificarse para uso terapéutico, y células que pueden llevar a cabo este proceso.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos mejorados para la producción de proteínas recombinantes activas de mamíferos, incluyendo proteínas complejas de mamíferos.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos mejorados para la producción de altos niveles de proteínas recombinantes de mamíferos, en particular humanas.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar organismos transformados que proporcionen altos niveles de expresión de proteínas de mamíferos recombinantes solubles o insolubles.

Sumario de la invención

Se ha descubierto que *Pseudomonas fluorescens* es un organismo superior para la producción de proteínas recombinantes, y en particular proteínas recombinantes de mamífero, tales como proteínas humanas recombinantes. Con base en estos descubrimientos, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína o péptido recombinante de mamífero en una célula huésped de *Pseudomonad*, comprendiendo el método:

a. transformar la célula huésped de *Pseudomonad* con un ácido nucleico que codifica una proteína o péptido recombinante de mamífero; y

b. hacer crecer la célula bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína o péptido recombinante de mamífero; y

c. aislar la proteína o péptido recombinante,

en donde la proteína o péptido recombinante está presente en la célula huésped en forma soluble o insoluble, y

en donde la proteína o péptido recombinante de mamífero es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una célula de *Pseudomonas* que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano recombinante o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente en donde la célula es una célula de *Pseudomonas fluorescens*.

- 5 En una realización, la invención proporciona un método para producir una proteína de mamífero en un organismo *P. fluorescens* en el que la proteína se produce en un nivel más alto o concentración por célula o por litro de reacción de fermentación que en un organismo *E. coli* en condiciones comparables. En otra realización más, la invención proporciona un método de producción de proteínas de mamífero en un organismo *P. fluorescens* en un cultivo por lotes que produce mayores cantidades de proteína por litro que un lote correspondiente a organismos recombinantes de *E. coli*.
- 10 Condiciones comparables o condiciones sustancialmente comparables se refieren particularmente a la expresión de proteína recombinante usando el mismo promotor transcripcional operativamente enlazado y el sitio de unión ribosómica en diferentes organismos, y usando las mismas condiciones iniciales de inducción. Condiciones comparables pueden incluir además el uso del mismo vector y elementos reguladores asociados, que incluyen, pero no se limitan a, secuencias potenciadoras, secuencias de terminación y secuencias de origen o de replicación.
- 15 Condiciones comparables también pueden incluir el mismo volumen total de reacción de fermentación celular. Condiciones comparables también pueden incluir la misma concentración de células totales por litro de reacción. En una realización, las condiciones también incluyen tiempos de inducción totales (antes de la medición) que son similares o iguales. Sin embargo, en otra realización, los tiempos de inducción pueden variar dependiendo del organismo. Específicamente, *P. fluorescens* tiene una capacidad para aumentar el tiempo de crecimiento en *E. coli*
- 20 sin producción de proteína reductora, de modo que la producción de proteína se puede medir en *P. fluorescens* en un punto de tiempo en el que las células de *E. coli* son en gran parte silenciosas. Una forma de medir las condiciones comparables es comparar el porcentaje de proteína recombinante por proteína celular total. Las condiciones comparables tampoco requieren medios idénticos para el crecimiento. Los medios se pueden ajustar para garantizar una producción óptima para los organismos individuales.
- 25 En otra realización, la invención proporciona un método para producir proteínas recombinantes de mamífero produciendo las proteínas en un organismo *P. fluorescens* y aislar la proteína producida. En una subrealización, el método incluye purificar sustancialmente la proteína. En una realización, la proteína se deriva de una proteína humana, o se humaniza.
- 30 La invención también proporciona un método para producir proteína o péptido recombinante de mamífero en *P. fluorescens*, en donde la proteína o péptido recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en al menos las siguientes realizaciones:
- (i) la producción de proteínas recombinantes de mamíferos, incluidas las humanas, presentes en la célula en un intervalo de entre 1 y 75 por ciento de proteína celular total (% de pct), o en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más;
- 35 (ii) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que son solubles y están presentes en el citoplasma de la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más;
- (iii) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que son insolubles en el citoplasma de la célula, en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente
- 40 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más;
- (iv) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que son solubles en el periplasma de la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más;
- 45 (v) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que son insolubles en el periplasma en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más;
- (vi) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, en la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct, o particularmente al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, cuando se cultiva a una densidad celular de al menos 40 g/L;
- 50 (vii) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, presentes en la célula en una forma activa;
- (viii) la producción de proteínas recombinantes de múltiples subunidades de mamífero, incluidas las humanas, en forma activa;
- (ix) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que luego se aíslan y purifican; y

(x) la producción de proteínas recombinantes de mamífero, incluidas las humanas, que se renaturalizan.

En una realización, la proteína recombinante de mamífero se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa, o fragmento de anticuerpo.

La célula de *Pseudomonads* del segundo aspecto de la invención incluye:

- 5 (i) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, a un nivel o concentración superior a un organismo *E. coli* correspondiente cuando se cultiva en condiciones sustancialmente correspondientes, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- 10 (ii) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas y péptidos recombinantes humanas, que están presentes en la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- (iii) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, proteínas que están presentes en la célula en forma activa, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un
15 fragmento de anticuerpo;
- (iv) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, que son solubles en el citoplasma de la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- 20 (v) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, que son insolubles en el citoplasma de la célula en un intervalo entre 1 y 75% de pct o en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- (vi) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, que son solubles en el periplasma de la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de
25 aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- (vii) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes humanas, que son insolubles en el periplasma de la célula en un intervalo de entre 1 y 75% de pct o, en particular, al menos más de aproximadamente 5% de pct, 10% de pct, al menos 15% de pct, al menos 20% de pct o más, en donde la
30 proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- (viii) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes de múltiples subunidades humanas, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo;
- (ix) organismos *Pseudomonas fluorescens* que se transforman para producir proteínas recombinantes de múltiples subunidades humanas, presentes en la célula en forma activa, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo
35 o un fragmento de anticuerpo.

En una realización alternativa, se usan organismos *Pseudomonas* y bacterias estrechamente relacionadas distintas de *fluorescens* como células huésped en esta invención, tal como se describe con más detalle a continuación. EN
40 una realización, la célula huésped se seleccionará de una especie de *Pseudomonas* no patógena. Del mismo modo, se puede usar cualquier cepa de *Pseudomonas fluorescens* que logre el objetivo deseado de la invención, que incluye, pero no se limita a la cepa MB101, o una cepa que se modifica para incluir al menos una copia insertada expresable en una célula huésped de al menos un codificador de transgén lacI que codifica la proteína represora Lac, tal como MB214 y MB217. El organismo *Pseudomonas* también puede modificarse genéticamente de forma
45 opcional para añadir o eliminar uno o más genes para mejorar el rendimiento, el procesamiento u otras características.

En una realización, el organismo *Pseudomonas* se transforma con un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de mamífero seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa, o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el organismo *P. fluorescens* expresa una proteína recombinante de mamífero seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa, y un fragmento de anticuerpo.

50 La proteína recombinante humana o de mamífero expresada típicamente tendrá una masa de al menos aproximadamente 1 kD, y hasta aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 kD, a menudo entre aproximadamente 10 kD y aproximadamente 100 kD, y habitualmente mayor que aproximadamente 30 kD.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra hu- γ -IFN purificado a partir de la fracción soluble de las muestras de *P. fluorescens* que muestran actividad comparable a un estándar comercialmente disponible.

La Figura 2 es una imagen de un ELISA que muestra la actividad de Gal13 purificada en *P. fluorescens* y *E. coli*.

5 La Figura 3 representa construcciones de expresión de hormona de crecimiento humana. La secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humano que carece de su secuencia señal de secreción nativa se muestra en A. Las construcciones de plásmido para la expresión en *P. fluorescens* (pDOW2400) y *E. coli* (412-001.hGH) se muestran en B.

10 La Figura 4 es una imagen de un análisis de SDS-PAGE de fracciones solubles e insolubles de hGH expresadas en *P. fluorescens* y *E. coli*. El tiempo posterior a la inducción se denota por 10, 124, 148, 0 o 3. Las flechas grandes indican la posición de la proteína hGH de 21 kDa.

15 La Figura 5 muestra un análisis SDS-PAGE de la expresión de γ -IFN en células de *E. coli* frente a células de *P. fluorescens*. Se resolvieron fracciones solubles (S) e insolubles (I) de muestras tomadas a las 0, 3, 24 y 48 horas después de la inducción (10, etc.). El γ -IFN expresado en *E. coli* se muestra en el panel A, γ -IFN expresado en *P. fluorescens* se muestra en el panel B. Se cargaron 5 μ L de muestras de A575-20 en un gel Bis-Tris NuPAGE al 10% y se resolvieron en IX MES. Las flechas indican la posición de la proteína recombinante. Los análisis Western se muestran en los paneles C (*E. coli*) y D (*P. fluorescens*).

La Figura 6 muestra la sustitución del gen de la toxina BuiBui por el gen BGI en los sitios *SpeI* y *XhoI* de pMYC1803.

La Figura 7 muestra que todos los transformantes seleccionados tenían el inserto de interferón deseado, como se verificó secuenciando el ADN insertado.

20 La Figura 8 representa la secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión del anticuerpo de cadena sencilla gal2-proteína de unión a fosfato.

La Figura 9 representa la secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión del anticuerpo de cadena sencilla gal2-proteína de unión a fosfato.

25 La Figura 10 representa la secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión de la hormona de crecimiento humana-proteína de unión a fosfato.

La Figura 11 representa la secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión de la hormona de crecimiento humana-proteína de unión a fosfato.

Descripción detallada de la invención

Método para producir proteínas recombinantes de mamífero

30 La invención proporciona métodos y organismos *Pseudomonas fluorescens* transformados que producen proteínas recombinantes de mamífero, en donde las proteínas son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

35 En una realización, la invención proporciona un método para producir proteínas recombinantes de mamífero produciendo las proteínas en un organismo *P. fluorescens* y aislando la proteína producida. La proteína puede aislarse después de la expresión mediante técnicas conocidas en el arte, que incluyen, entre otras, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, afinidad de anticuerpos, exclusión por tamaño o cualquier otro método que elimine una porción sustancial de los restos celulares de la proteína. En una subrealización, el método proporciona una proteína sustancialmente purificada. La proteína aislada puede tener una actividad similar a la de la proteína nativa de la que se deriva. La proteína puede aislarse en un estado o conformación correctamente plegada, aproximándose a la de la proteína nativa, o puede renaturalizarse o modificarse adicionalmente para ponerla en una conformación plegada correctamente. En una subrealización, la proteína se deriva de una proteína humana, o se humaniza. Una proteína "humanizada" es típicamente una proteína quimérica de tipo mamífero que está parcialmente compuesta por una secuencia de proteína derivada de humanos. La humanización es particularmente útil en la producción de anticuerpos y el desarrollo de anticuerpos humanizados se ha descrito ampliamente, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.800.738.

40 En una realización, la expresión de la proteína por la célula huésped es seguida por el aislamiento de la proteína. En otra realización, la proteína del péptido se purifica. En una realización alternativa, la proteína se purifica después del aislamiento de la proteína. Opcionalmente, la proteína aislada o purificada puede renaturalizarse o replegarse para producir proteínas activas.

50 En una realización, la invención proporciona un método para producir una proteína de mamífero en un organismo *P. fluorescens* en el que la proteína se produce a un nivel o concentración más alta que en un organismo *E. coli*. La idoneidad de los organismos *P. fluorescens* para la producción de alto nivel de proteínas de mamífero fue inesperada con base a la falta de éxito en la producción de tales proteínas en estos organismos en la técnica anterior. Los presentes inventores han descubierto que estos organismos son de hecho capaces de altos niveles de

producción de proteínas de mamífero, y típicamente expresan proteínas con mayor rendimiento o en niveles más altos que *E. coli* cuando se prueban en los ensayos correspondientes. En otra realización, la invención proporciona un método para producir proteínas de mamífero en un organismo *P. fluorescens* en un cultivo por lotes que produce mayores cantidades de proteína por litro que un lote correspondiente de organismos *E. coli* recombinantes.

- 5 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos que incluyen la producción de proteínas recombinantes de múltiples subunidades de mamífero, incluidos humanos, en forma activa en *P. fluorescens*; y la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, que incluyen anticuerpos de una sola cadena y fragmentos Fab en *P. fluorescens*.

- 10 En una realización, la proteína recombinante de mamífero se produce como un multímero, o en un precursor concatémico, por ejemplo, en forma de al menos dos unidades pequeñas de péptido (1-15 aminoácidos) en tándem. En una realización alternativa, la proteína recombinante de mamífero no se produce como un multímero, o en precursores concatémicos, sino que se produce como un polipéptido de una sola cadena.

Cribado de biomoléculas

- 15 Como se describe en el presente documento, los organismos *P. fluorescens* se pueden usar en un proceso de cribado de bibliotecas de biomoléculas de mamífero para identificar al menos una que exhiba una actividad o propiedad deseada. Las células de *P. fluorescens* pueden transformarse con varios ácidos nucleicos derivados de mamífero para los que se desea realizar pruebas, produciendo una biblioteca de células huésped transformadas. Tras la expresión, se producen los polipéptidos codificados por al menos algunos de los ácidos nucleicos para analizar ya sea en el citoplasma o después de la recuperación de la célula.

- 20 Los ejemplos de actividades y propiedades para las que se pueden realizar pruebas incluyen: nivel de expresión del polipéptido; estabilidad del polipéptido; y actividades y propiedades biocatalíticas. Ejemplos ilustrativos de actividades y propiedades biocatalíticas incluyen: actividad enzimática; interacciones/unión a proteínas; estabilización de proteínas; uso de sustrato; formación de productos; condiciones de reacción, tales como pH, salinidad o temperatura de reacción; parámetros biocatalíticos para una reacción catalizada dada, tales como Km y Vmáx; y el comportamiento de estabilidad, tal como la termoestabilidad y la vida media de los biocatalizadores. Los resultados de la prueba obtenidos se pueden usar para un miembro o miembros seleccionados de la biblioteca para un mayor desarrollo.

Expresión de la proteína

- 30 Un aspecto clave de esta invención es la expresión de altos niveles de proteínas recombinantes de mamífero, por ejemplo, de humano, en un intervalo de entre 1 y 75 por ciento de proteína celular total (% de pct) por expresión en organismos *P. fluorescens*. Las proteínas expresadas son solubles o insolubles mientras están en la célula d *P. fluorescens*. Dichos niveles elevados de proteínas recombinantes solubles o insolubles de mamífero pueden ser una mejora con respecto a los sistemas de expresión de proteínas de mamífero conocidos previamente. En particular, altos niveles de proteínas de mamífero recuperadas en reacciones de fermentación a gran escala típicamente no son posibles con técnicas conocidas.

- 35 El método del primer aspecto de la invención permite niveles de expresión de proteínas de mamífero que superan los encontrados en sistemas de expresión de *E. coli*. En una realización, la concentración de proteína recombinante en cada célula es mayor que la encontrada en *E. coli* en ensayos comparativos. En una realización, el nivel de proteína recombinante en comparación con la proteína celular total medida en el sistema de expresión de *P. fluorescens* es más alto que el de la misma proteína recombinante expresada en *E. coli*. En otra realización, el nivel o cantidad de proteína soluble en el sistema de expresión de *P. fluorescens* descrito aquí es más alto que el nivel o la cantidad de proteína recombinante soluble en un sistema de expresión comparable de *E. coli*. En otra realización, la cantidad total de proteína activa es mayor que la cantidad derivada de un sistema de expresión de *E. coli*. En una realización separada, el nivel de proteína activa recombinante en comparación con la proteína celular total medida en el sistema de expresión de *P. fluorescens* es más alto que el de la misma proteína recombinante expresada en *E. coli*. En una realización, el nivel, concentración o cantidad de proteína expresada en *P. fluorescens* es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces o más, el nivel, concentración o cantidad de proteína recombinante expresada en *E. coli* en ensayos comparables.

- 50 Uno de los beneficios de *P. fluorescens* como un sistema de expresión es que las células se pueden cultivar en cultivos a gran escala sin afectar negativamente su capacidad para la producción de proteínas. Esta capacidad excede la que se encuentra en otros sistemas bacterianos, tales como *E. coli*. En otra realización, el método incluye producir proteínas de mamífero en cultivos por lotes en los que la proteína recombinante se produce a un nivel total más alto en *P. fluorescens* que en cultivos por lotes de *E. coli*. En otra realización más, la invención proporciona un método de producción de proteínas de mamífero en un organismo *P. fluorescens* en un cultivo por lotes que produce mayores cantidades de proteína por litro que un lote correspondiente de organismos *E. coli* recombinantes.

La invención generalmente proporciona métodos y organismos *P. fluorescens* transformados que proporcionan niveles de expresión de 1-75% de proteína celular total (pct) de proteínas recombinantes de mamífero solubles o

insolubles. Las proteínas recombinantes de mamífero expresadas en la célula se pueden expresar en una forma activa. En otras realizaciones, el *P. fluorescens* proporciona al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 o 75% de pct de proteínas recombinantes de mamífero.

Estas proteínas pueden ser solubles, y cuando son solubles, pueden estar presentes en el citoplasma o periplasma de la célula durante la producción. Las proteínas solubles se liberan fácilmente de la célula mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, ruptura de la membrana celular por presión (es decir, el método de prensa "francés"), o por degradación mediante lisozima de la membrana celular. Las células típicamente también pueden lisarse usando detergentes, tales como detergentes no iónicos. Las proteínas que son solubles se pueden estabilizar aún más ajustando los componentes del regulador, tales como el pH del regulador, las concentraciones de sal o los componentes de proteínas adicionales (por ejemplo, en complejos de múltiples subunidades). Las proteínas solubles se pueden aislar o purificar a partir de otras proteínas y restos celulares mediante, por ejemplo, centrifugación y/o cromatografía tales como de exclusión por tamaño, intercambio aniónico o catiónico, o cromatografía de afinidad.

Las proteínas también pueden ser insolubles. Las proteínas insolubles se encuentran típicamente en los cuerpos de inclusión en el citoplasma, pero también a menudo en el periplasma. No todas las proteínas insolubles están en cuerpos de inclusión, y también se pueden encontrar en agregados de membrana, como pequeños agregados de proteínas o en cualquier otra forma insoluble en el citoplasma o periplasma. Las proteínas insolubles se pueden renaturalizar típicamente usando, por ejemplo, agentes reductores tales como urea o clorhidrato de guanidina. Las proteínas insolubles o agregados proteicos se pueden aislar, por ejemplo, mediante centrifugación y/o cromatografía tal como cromatografía de exclusión por tamaño. Las proteínas en agregados insolubles pueden separarse típicamente por solubilización de los agregados usando, por ejemplo, micelas o micelas inversas como se divulga en Vinogradov, et al. (2003) Anal Biochem. 15; 320 (2): 234-8.

En una realización particular, la célula huésped de *Pseudomonas* puede tener un nivel de expresión de péptido, polipéptido, proteína o fragmento de los mismos recombinante de mamífero de al menos 1% de pct y una densidad celular de al menos 40 g/L, cuando se cultiva (es decir, dentro de un intervalo de temperatura de aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 55°C, inclusive) en un medio de sales minerales. En una realización particular, el sistema de expresión tendrá una proteína recombinante de péptido, incluyendo proteína recombinante de mamífero, nivel de expresión de al menos 5% de pct y una densidad celular de al menos 40 g/L, cuando crezca (es decir, dentro de un intervalo de temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 55°C, inclusive) en un medio de sales minerales a una escala de fermentación de al menos 10 litros.

Los niveles de expresión se pueden medir mediante técnicas estándar conocidas en el arte. En una realización, la cantidad de proteína (en gramos) se compara con la cantidad en gramos de proteína celular total en una muestra dada. En otra realización, la medición es un nivel de proteína recombinante por litro. En otra realización, el nivel o cantidad puede medirse en comparación con un estándar conocido, tal como un control de BSA. El nivel o cantidad de proteína recombinante se puede medir, por ejemplo, analizando la absorción de luz de una proteína purificada, midiendo la afinidad de un marcador para la proteína (tal como la afinidad de un anticuerpo) y comparándola con un estándar conocido, o midiendo el nivel de actividad en comparación con un estándar conocido (tal como una cantidad conocida de proteína activa purificada).

Se ha encontrado que, en ciertas situaciones, no se requieren condiciones o agentes promotores de enlaces disulfuro adicionales para recuperar polipéptidos objetivo que contienen enlaces disulfuro en forma soluble activa, cuando se usa una bacteria *Pseudomonas fluorescens* como célula huésped de expresión. Por lo tanto, en una realización, el péptido, polipéptido, proteína o fragmento transgénico contiene al menos un enlace disulfuro intramolecular en su estado nativo. En otras realizaciones, la proteína puede contener hasta 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 o más enlaces disulfuro en su estado nativo.

En algunas realizaciones, la proteína se expresa o se encuentra en el periplasma de la célula durante la producción antes de la purificación o el aislamiento. La proteína puede ser secretada en el periplasma fusionándose a una secuencia de secreción de señal apropiada. En una realización, la secuencia señal es una secuencia señal que es nativa del genoma de *P. fluorescens*. En realizaciones específicas, la secuencia señal es una proteína de unión a fosfato, un péptido señal de secreción de proteína de unión a Lys-Arg-Orn (LAObp o KRObp), un péptido señal de secreción de Porina E (OpreE) de la membrana externa, un péptido señal de secreción de azurina, un péptido señal de secreción de proteína de unión al hierro (III) (Fe(III)pb), o un péptido señal de secreción de lipoproteína B (LprB).

En una realización, el péptido, polipéptido, proteína recombinante o fragmento de los mismos tiene una conformación intramolecular plegada en su estado activo. *P. fluorescens* típicamente produce proteínas de mamífero más eficientemente en la conformación correctamente plegada. En una realización, más del 50% del péptido, polipéptido, proteína o fragmento de los mismos transgénico expresado producido puede producirse como péptidos, polipéptidos, proteínas individuales o fragmentos de los mismos en forma soluble activa o insoluble, pero renaturalizable en el citoplasma o periplasma. En otra realización, aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de la proteína expresada se obtiene o se puede renaturalizar en forma activa.

Definiciones

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "proteína" se usa para incluir cualquier concatámero o polímero de aminoácidos. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente e incluyen polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como también polímeros de aminoácidos de origen natural.

- 5 El término "aislado" se refiere a ácido nucleico, proteína o péptido que está sustancialmente o esencialmente libre de otros componentes materiales que normalmente lo acompañan tal como se encuentran en su estado nativo cuando están en una célula, por ejemplo, en otros componentes celulares.

- 10 El término "purificado" o "sustancialmente purificado" se usa para indicar que la proteína se separa de otros componentes celulares y se separa de otras proteínas y péptidos encontrados en la célula que no están en un complejo nativo con la proteína. En realizaciones particulares, las proteínas purificadas tienen una pureza aprobada para uso terapéutico o veterinario según se define mediante las directrices estándar de cGMP o aprobadas por la FDA.

- 15 El término "porcentaje de proteína celular total" ("pct") significa la cantidad de proteína en la célula huésped como un porcentaje de proteína celular agregada. Alternativamente, el término significa una medida de la fracción de proteína celular total que representa la cantidad relativa de una proteína dada expresada por la célula.

El término "unido operativamente" se refiere a cualquier configuración en la que los elementos reguladores transcripcionales y de traducción están unidos covalentemente a la secuencia codificante en tal o tales disposición o disposiciones, con respecto a la secuencia codificante, que en y por acción de la célula huésped, los elementos reguladores pueden dirigir la expresión de la secuencia de codificación.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" pretende incluir o designar a cualquier animal en la clase Mammalia que incluye mamíferos humanos o no humanos, tales como, pero sin limitación, porcinos, ovinos, bovinos, roedores, ungulados, cerdos, marranos, ovejas, corderos, cabras, ganado, ciervos, mulas, caballos, monos, simios, perros, gatos, ratas y ratones.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "proteína recombinante de mamífero" o péptido incluye proteínas derivadas de una secuencia de proteína de mamífero nativa o derivadas o generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico nativa de mamífero. Dichas proteínas recombinantes pueden producirse a partir de una secuencia de ácido nucleico que se corresponde sustancialmente con el ARNm nativo de mamífero o ADNc sustancialmente correspondiente, o fragmentos de los mismos. La secuencia puede ajustarse en consecuencia con base en el uso de codones de células huésped específicas tal como se conoce en la técnica.

- 30 La frase "sustancialmente correspondiente" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a los residuos en las dos secuencias que tienen al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de identidad cuando se alinean para correspondencia máxima sobre un dominio de la proteína, medida usando un algoritmo conocido en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444; Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 (BLAST)), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para información de biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- 40 El término "fragmento" significa una porción o secuencia parcial de una secuencia de un nucleótido, proteína o péptido.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "soluble" significa que la proteína no se precipita por centrifugación a una gravedad entre aproximadamente 5.000x y 20.000x cuando se centrifuga durante 10-30 minutos en un regulador bajo condiciones fisiológicas. Las proteínas solubles no son parte de un cuerpo de inclusión u otra masa precipitada.

Como se usa en el presente documento, el término "insoluble" significa que la proteína puede precipitarse por centrifugación a una gravedad de entre 5.000x y 20.000x cuando se centrifuga durante 10-30 minutos en un regulador en condiciones fisiológicas. Las proteínas insolubles pueden ser parte de un cuerpo de inclusión u otra masa precipitada.

- 50 El término "cuerpo de inclusión" pretende incluir cualquier cuerpo intracelular contenido dentro de una célula en el que se haya secuestrado un agregado de proteínas.

- 55 Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" significa o bien i) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que al menos es 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98% similar a la secuencia de una proteína original dada y que conserva una función deseada de la proteína original o ii) un ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 70, 75, 80, 5, 90, 95 o 98% similar a la secuencia de un ácido nucleico dado y que conserva una función deseada de la secuencia de ácido nucleico original. En todas las realizaciones de esta

invención y divulgación, cualquier proteína, péptido o ácido nucleico divulgado puede ser sustituido con una proteína, péptido o ácido nucleico homólogo o sustancialmente homólogo que retiene una función deseada. En todas las realizaciones de esta invención y divulgación, cuando se divulga cualquier ácido nucleico, se debe suponer que la invención también incluye todos los ácidos nucleicos que se hibridan con el ácido nucleico divulgado.

- 5 En una realización no limitante, la secuencia de aminoácidos no idéntica del polipéptido homólogo puede ser aminoácidos que son miembros de cualquiera de los 15 grupos conservadores o semiconservadores que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos similares de sustitución de aminoácidos

Grupos conservadores (8)	Grupos semiconservadores (7)
Arg, Lys	Arg, Lys, His
Asp, Glu	Asn, Asp, Glu, Gln
Asn, Gln	
Ile, Leu, Val	Ile, Leu, Val, Met, Phe
Ala, Gly	Ala, Gly, Pro, Ser, Thr
Ser, Thr	Ser, Thr, Tyr
Phe, Tyr	Phe, Trp, Tyr
Cys (no cistina), Ser	Cys (no cistina), Ser, Thr

10 Tipos de proteínas de mamífero producidas

En general, la proteína recombinante de mamífero puede ser cualquier proteína de mamífero seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa de proteína de múltiples subunidades, un fragmento de anticuerpo de proteína de múltiples subunidades, un anticuerpo de longitud completa y un fragmento de anticuerpo.

- 15 una proteína transportadora de sangre, una enzima, un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo o un factor de transcripción.

La secuencia de aminoácidos de la proteína puede alterarse para ajustarse a las cualidades deseadas, tales como para asegurar ciertos tipos de interacciones. La secuencia puede, por ejemplo, ajustarse para reducir la inmunorreactividad, o para aumentar la absorción, reducir la excreción o bien, mejorar la biodisponibilidad en un organismo tal como un mamífero. La secuencia de aminoácidos de la proteína se puede ajustar para asegurar

20 ciertas modificaciones postraduccionales o conformaciones de la proteína. Para referencia, se divulga en este documento también una proteína de mamífero que es una quimioquina o citoquina. La proteína de mamífero es una de las siguientes proteínas: IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12elasti, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-18BP α , IL-23, IL-24, VIP, eritropoyetina, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), MSF, ligando FLT-3, EGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por ejemplo, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 o FGF-7), factores de crecimiento similares a la insulina (por ejemplo, IGF-1, IGF-2); factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF, linfotóxina), factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); interferones (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ); factor inhibidor de la leucemia (LIF); factor neurotrófico ciliar (CNTF); oncostatina M; factor de células madre (SCF); factores de crecimiento transformantes (por ejemplo, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 1, TGF- β 1); superfamilia de TNF (por ejemplo, LIGHT/TNFSF14, STALL-1/TNFSF13B (Bly5, BAFF, GRACIAS), TNF- α /TNFSF2 y TWEAK/TNFSF12); o quimioquinas (BCA-1/BLC-1, BRAK/Kec, CXCL16, CXCR3, ENA-78/LIX, Eotaxina 1, Eotaxina 2/MIP1F-2, Exodus-2/SLC, Fractalquina/Neurotactina, GRO α /MGSA, HCC-1, I-TAC, linfotactina/ATAC/SCM, MCP-1/MCAF, MCP-3, MCP-4, MDC/SPCT-1/ABCD-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α /GRO β , MIP-3 α /Exodus/LARC, MIP-3 α /Exodus-3/ELC, MIP-4/PARC/DC-CK1, PF-4, RANTES, SDF1 α , TARC o TECK).

35 Alternativamente, la proteína no es una quimioquina o citoquina. La proteína de mamífero no es una de las siguientes proteínas: IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12elasti, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-18BP α , IL-23, IL-24, VIP, eritropoyetina, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), MSF, ligando FLT-3, EGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por ejemplo, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 o FGF-7), factores de crecimiento similares a la insulina (por ejemplo, IGF-1, IGF-2); factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF, linfotóxina), factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); interferones (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ); factor inhibidor de la leucemia (LIF); factor neurotrófico ciliar (CNTF); oncostatina M; factor de células madre (SCF); factores de crecimiento transformantes (por ejemplo, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 1, TGF-

$\beta 1$); superfamilia de TNF (por ejemplo, LIGHT/TNFSF14, STALL-1/TNFSF13B (BLY5, BAFF, THANK), TNF- α /TNFSF2 y TWEAK/TNFSF12); o quimioquinas (BCA-1/BLC-1, BRAK/Kec, CXCL16, CXCR3, ENA-78/LIX, Eotaxina 1, Eotaxina 2/MPIF-2, Exodus-2/SLC, Fractalquina/Neurotactina, GRO α /MGSa, HCC-1, I-TAC, linfotactina/ATAC/SCM, MCP-1/MCAF, MCP-3, MCP-4, MDC/SPCT-1/ABCD-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α /GRO β , MIP-3 α /Exodus/LARC, MIP-3 α /Exodus-3/ELC, MIP-4/PARC/DC-CK1, PF-4, RANTES, SDF1 α , TARC o TECK). La proteína no es una proteína porcina, particularmente no es un factor de crecimiento porcino.

En el contexto del primer y segundo aspecto, las proteínas recombinantes de mamífero, son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. Este aspecto de la presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, de una sola cadena y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una biblioteca de expresión de Fab.

Producción de proteínas de múltiples subunidades

Para referencia, se describe la producción de proteínas de múltiples subunidades recombinantes de mamífero por una célula huésped de la especie *Pseudomonas fluorescens*. También se divulga aquí una célula huésped de la especie *Pseudomonas* que se ha transformado para expresar una proteína de múltiples subunidades recombinante de mamífero. Las proteínas de múltiples subunidades, que incluyen proteínas recombinantes de mamífero o humanas, se expresan en una célula huésped de *Pseudomonas*. La expresión de la proteína de múltiples subunidades por la célula huésped es seguida por el aislamiento de la proteína de múltiples subunidades. En otra realización, se purifica la proteína de múltiples subunidades del péptido. La proteína puede ser ensamblada por la célula antes de la purificación o aislamiento, o puede llevarse a cabo un ensamblaje adicional durante o después del aislamiento o la purificación. Opcionalmente, la proteína o cualquier porción de la misma puede renaturalizarse o replegarse para producir proteínas activas.

Se puede usar cualquiera de una variedad de vectores y sistemas de expresión para expresar la proteína de múltiples subunidades en la célula huésped. Las múltiples subunidades pueden estar ubicadas en un único vector, opcionalmente unido operativamente a diferentes promotores, opcionalmente en una secuencia policistónica. Cada subunidad también puede estar en diferentes vectores. Se pueden usar múltiples vectores. Cada subunidad puede estar bajo el control de uno o más marcadores de selección. Los elementos reguladores se pueden incluir en el vector, incluidas las secuencias señal de secreción periplásmica, los sitios internos de entrada al ribosoma, las secuencias activadoras, los promotores y las señales de terminación.

Las proteínas de múltiples subunidades se pueden expresar en sistemas de expresión que usan *Pseudomonas* con marcadores de selección auxotróficos como se divulga en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/994,138 de Dow Global Technologies presentada el 19 de noviembre de 2004, donde el control de cada ácido nucleico que codifica una subunidad está bajo el control de un marcador de selección auxotrófico. Las proteínas de múltiples subunidades que se pueden expresar incluyen proteínas homoméricas y heteroméricas. Las proteínas de múltiples subunidades pueden incluir dos o más subunidades, que pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína homomérica que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más subunidades. La proteína también puede ser una proteína heteromérica que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más subunidades.

Las proteínas de mamífero de múltiples subunidades que están dentro del alcance de la presente invención incluyen: anticuerpos de cadena completa y fragmentos de anticuerpos.

Producción de proteínas de la sangre

Para referencia, se describe la producción de proteínas recombinantes de la sangre de mamífero. La expresión de la proteína de la sangre por la célula huésped es seguida por el aislamiento de la proteína de la sangre. Se purifica la proteína de la sangre. Después del aislamiento de la proteína de la sangre, se purifica la proteína de la sangre. Opcionalmente, la proteína puede renaturalizarse o replegarse para producir proteína activa. En general, una proteína recombinante de la sangre se produce transformando una célula huésped adecuada, tal como una célula huésped de *P. fluorescens*, con una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de la sangre, el cultivo de la célula huésped transformada en condiciones apropiadas para la expresión, y opcionalmente aislamiento, o aislamiento y purificación de la proteína recombinante de la sangre expresada por la célula.

Se describe una célula huésped de la especie *Pseudomonas* que se ha transformado para expresar una proteína recombinante de la sangre de mamífero con un vector que contiene genes apropiados y elementos reguladores para la expresión de la proteína de interés de la sangre.

Las proteínas sanguíneas que se pueden expresar incluyen, pero no se limitan a: proteínas transportadoras, tales como albúmina, que incluyen albúmina humana (SEQ ID No. 1, Tabla 2) y albúmina bovina; transferrina, que incluye transferrina humana (SEQ ID No. 2, Tabla 2), transferrina bovina, transferrina de rata, transferrina recombinante, semimoléculas de transferrina recombinantes, semimoléculas de transferrina recombinantes que tienen propiedades alteradas; haptoglobina; fibrinógeno y otros factores de coagulación; componentes del complemento; inmunoglobulinas; inhibidores enzimáticos; precursores de sustancias tales como angiotensina y bradiquinina; insulina; endotelina; globulina que incluye alfa, beta y gamma-globulina; y otros tipos de proteínas, péptidos y fragmentos de los mismos que se encuentran principalmente en la sangre de los mamíferos. Se han informado las

secuencias de aminoácidos para numerosas proteínas sanguíneas (véase, S.S. Baldwin (1993) Comp. Biochem Physiol. 106b: 203-218), que incluyen la secuencia de aminoácidos para albúmina sérica humana (Lawn, LM, et al., (1981) Nucleic Acids Research 9: 22; páginas 6103-6114) y transferrina sérica humana (Yang, F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81; páginas 2752-2756).

- 5 Se describe la producción de albúmina en *P. fluorescens*, que comprende transformar una célula huésped de *P. fluorescens* con un vector de expresión que contiene una secuencia o secuencias de ácido nucleico y elementos reguladores para la expresión de albúmina, el cultivo de la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de la albúmina, y la recuperación de la albúmina expresada por *P. fluorescens*. La albúmina expresada se selecciona del grupo que consiste en albúmina humana, albúmina bovina, albúmina de conejo, albúmina de pollo, albúmina de rata y albúmina de ratón. La albúmina puede fusionarse a un polipéptido terapéuticamente activo, que puede ser de origen mamífero o no mamífero.

- 10 Se describe la producción de una transferrina en *P. fluorescens*, que comprende transformar una célula huésped de *P. fluorescens* con un vector de expresión que contiene ácido nucleico y elementos reguladores para la expresión de la transferrina, cultivando la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de la transferrina. Después de la expresión de la transferrina, la proteína se puede aislar. La transferrina puede purificarse después del aislamiento. La transferrina expresada se selecciona del grupo que consiste en transferrina sérica humana, transferrina humana glicosilada, transferrina humana no glicosilada, semimolécula del terminal N de transferrina humana, transferrina bovina, transferrina de rata, transferrina de ratón, transferrina de primate, transferrina recombinante, semimoléculas recombinantes de transferrina, semimoléculas recombinantes de transferrina que tienen propiedades alteradas, polinucleótidos de transferrina, polipéptidos de transferrina codificados por polipéptidos de transferrina, polipéptidos de transferrina, anticuerpos de transferrina, fragmentos de transferrina y transferrina fusionados a un polipéptido terapéuticamente activo.

- 25 Se describe la producción de una globulina en *P. fluorescens*, que comprende transformar una célula huésped de *P. fluorescens* con un vector de expresión que contiene ácido nucleico y elementos reguladores para la expresión de la globulina, cultivando la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de la globulina y opcionalmente aislando la proteína. Después de la expresión, se aísla la globulina y se purifica a partir de la célula huésped. La globulina expresada se selecciona del grupo que consiste en globulina humana, globulina bovina, globulina de conejo, globulina de rata, globulina de ratón, globulina de oveja, globulina de mono, globulinas de unión a esteroides y globulina fusionada a un polipéptido terapéuticamente activo.

- 30 Se describe la producción de una insulina en *P. fluorescens*, que comprende transformar una célula huésped de *P. fluorescens* con un vector de expresión que contiene ácido nucleico y elementos reguladores para la expresión de la insulina, cultivando la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de la insulina y opcionalmente aislando la proteína. La insulina puede aislarse y purificarse después de la producción de insulina por la célula huésped. La insulina expresada se selecciona del grupo que consiste en insulina humana, insulina bovina, insulina de ratón, insulina de rata, insulina porcina, insulina de mono e insulina fusionada a un polipéptido terapéuticamente activo. El número de acceso para los genes de insulina humana es J00265, y para el gen de insulina humana sintética, el número de acceso es J02547.

- 40 El ADN de longitud completa de producción de proteínas sanguíneas recombinantes o ADN truncado que codifica el lóbulo del terminal amino o del terminal carboxilo de proteínas sanguíneas o una porción del mismo puede obtenerse a partir de fuentes disponibles o puede sintetizarse de acuerdo con las secuencias conocidas mediante procedimientos estándar.

Tabla 2. Secuencias de proteínas sanguíneas que pueden ser expresadas por el sistema de la presente divulgación.

Secuencia de aminoácidos de albúmina de suero humano	SEQ. ID. No: 1	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGE ENFKALVLIQAQYLQCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVAD ESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIARRHPYFYAPELLFAKRYKAAFTTECCQAADKA ACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAW AVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECA DDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVEN DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFY ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFKQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALE VDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAAE GKKLVAASQAALGL (Lawn, et al. (1981) Nuc. Ac. Rsch. 9(22):6103-6114)
--	----------------	--

Secuencia de aminoácido de transferrina	SEQ. ID. No: 2	MRLAVGALLVCAVLGLCLAVDPKTVRWCAVSEHEATKC QSFDRDHMSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADA VTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYAV AVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYC DLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFFQLCQLCPGC GCSTLNQYFYGSYGAFAKCLKNGAGDVAFAVKHSTIFENLAN KADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR MGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLF KDSAHGFLKVPFRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCQEA PTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAET TEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLPVLAENY NKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKASDLTWDNLKGGKSC HTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKK DSSLCKLCMGSGNLNCEPNNKEGYGYGTGAFRCLVEKGD VAFVKHQTPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGT RKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQH LFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNT YEKYLGEYVKAAGN LKRCSTSSLEACTFRRP (Strausberg (2002) PNAS, 99:16899-16903)
Secuencia de ADNc de insulina humana	SEQ. ID. No: 3	atggccctgtggatgcgcctcctgccctgtggcgtgctggcccttggggacctgacc cagccgcagccttgtgaaccaacacctgtgcggctcacacctgtggaagctctaccta gtgtgcgggaacgaggtctctctacacccaagaccgccgggagggcagggacct gcaggtggggcaggtggagctggcgggggccctgtgtcaggcagcctgcagccctg gccttgagggggtccctgcagaagcgtggcattgtggaacaatgctgtaccagcatctgct ccctctaccagctggagaactactgcaactag

Producción de enzimas

Se describe la producción de enzimas o cofactores recombinantes de mamífero por una célula huésped de la especie *Pseudomonas fluorescens*. Se describe una célula huésped de la especie de *Pseudomonas* que se ha transformado para expresar una enzima o cofactor recombinante de mamífero.

Las enzimas y cofactores expresados de acuerdo con lo anterior, incluyen, pero sin limitación, aldolasas, amino oxidasas, aminoácidos oxidasas, aspartasas, enzimas dependientes de B₁₂, carboxipeptidasas, carboxiesterasas, carboxilasas, quimotripsina, enzimas que requieren CoA, cianhidrina sintetisas, cistationa sintasas, descarboxilasas, deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas, deshidratasas, diaforasas, dioxigenasas, enoate reductasas, epóxido hidrasas, fumerasas, galactosa oxidasas, glucosa isomerasas, glucosa oxidasas, glicosiltrasferasas, metiltransferasas, nitrilo hidrasas, nucleósido fosforilasas, oxidorreductasas, oxinitilasas, peptidasas, glicosiltrasferasas, peroxidasas y enzimas fusionadas a un polipéptido terapéuticamente activo.

La enzima puede ser un polipéptido enzimático mesófilo, por ejemplo, uno que es deseable para uso terapéutico y/o diagnóstico humano y/o veterinario. Los ejemplos de tales enzimas mesófilas terapéuticas incluyen, por ejemplo, activador del plasminógeno tisular; uroquinasa, reptilasa, estreptoquinasa; catalasa, superóxido dismutasa; DNasa, aminoácido hidrolasas (por ejemplo, asparaginasa, amidohidrolasas); carboxipeptidasas; proteasas, tripsina, pepsina, quimotripsina, papaína, bromelina, collagenasa; neuraminidasa; lactasa, maltasa, sacarasa y arabinofuranosidasas.

Para referencia se describe aquí la producción de reemplazos de enzimas recombinantes en células de *P. fluorescens* transformando una célula huésped de *P. fluorescens* con un vector de expresión que contiene ácidos nucleicos y elementos reguladores para la expresión de reemplazos de enzimas recombinantes, y cultivo de la célula en condiciones adecuadas para la expresión de las sustituciones de enzimas recombinantes. Las sustituciones de enzimas recombinantes expresadas en la célula huésped se seleccionan del grupo que consiste en Algasidasa beta, Laronidasa y reemplazos de enzimas recombinantes fusionados a un polipéptido terapéuticamente activo.

Producción de anticuerpos de mamífero y fragmentos de anticuerpo

En una realización de la presente invención, se proporcionan la producción de fragmentos de Fab de una sola cadena recombinantes de mamífero y/o anticuerpos de cadena completa o fragmentos o porciones de los mismos por una célula huésped de la especie *P. fluorescens*. En una realización, después de la expresión de la proteína, la proteína es aislada y purificada. Opcionalmente, la proteína puede renaturalizarse para producir una proteína activa. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpo están opcionalmente unidos a una secuencia señal de secreción para dirigirse a la célula durante la producción.

En otra realización, se proporciona una célula huésped de la especie *Pseudomonas* que se ha transformado para expresar una cadena única recombinante de mamífero, fragmentos Fab y/o anticuerpos de cadena completa o fragmentos o porciones de los mismos.

En una realización, la célula de *P. fluorescens* puede producir un anticuerpo de una sola cadena o fragmentos o porciones del mismo. Un anticuerpo de una sola cadena puede incluir las regiones de unión a antígeno de anticuerpos en una única cadena polipeptídica plegada de manera estable. Los anticuerpos de una sola cadena son de menor tamaño que las inmunoglobulinas clásicas, pero pueden retener las propiedades de unión específicas del antígeno de los anticuerpos. Los anticuerpos de una sola cadena pueden usarse para productos terapéuticos, tales como anticuerpos de una sola cadena "desnudos", aglutinantes de anticuerpos biespecíficos, radioconjugados o como fusiones con dominios efectores, elementos de diagnóstico, tales como imágenes de tumores o ensayos marcadores de cáncer *in vivo* o *ex vivo*, herramientas de investigación, tales como la purificación y detección de proteínas, incluida la identificación y caracterización de nuevos objetivos terapéuticos, microarreglos de anticuerpos, tecnologías de visualización y/o vehículos para la administración de genes o fármacos.

En otra realización, la célula de *P. fluorescens* produce fragmentos Fab o porciones de los mismos. Los fragmentos Fab pueden ser una parte de un anticuerpo particular. El fragmento Fab puede contener el sitio de unión al antígeno. El fragmento Fab puede contener 2 cadenas: una cadena ligera y un fragmento de cadena pesada. Estos fragmentos pueden enlazarse a través de un enlazador o un enlace disulfuro.

En otras realizaciones de la presente invención, los anticuerpos de cadena completa se pueden expresar en *P. fluorescens* y otras especies de *Pseudomonas*. Un anticuerpo intacto que contiene la región Fc puede ser más resistente contra la degradación y la eliminación *in vivo*, teniendo así una semivida biológica más larga en circulación. Tales anticuerpos se pueden usar como un agente terapéutico para enfermedades que requieren terapias sostenidas.

En una realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo funcional o fragmento del mismo en especies de *Pseudomonas* proporcionando un vector de expresión que contiene secuencias cistónicas o policistónicas separadas. El vector de expresión separado del cistón puede contener un primer par promotor-cistón para la expresión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo par promotor-cistón para la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina, de manera que la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada se regulan independientemente por promotores separados. Cada cistón dentro del polinucleótido del casete de expresión puede incluir una región de inicio de la traducción (TIR) unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa. En una realización, las secuencias de la TIR se pueden manipular para proporcionar diferentes combinaciones de fuerza de traducción para cadenas ligeras y pesadas. En una realización alternativa, una secuencia de codificación de la cadena pesada puede localizarse en el mismo plásmido que una secuencia de codificación de la cadena ligera. En una realización alternativa, las secuencias de cadena pesada y ligera se encuentran en una secuencia policistónica dentro de un único plásmido, o codificadas en el genoma del huésped.

En otra realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo funcional o fragmento del mismo en una célula huésped transformada con dos unidades de traducción separadas que codifican respectivamente las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En una realización, el método incluye: a) cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para que la cadena ligera y la cadena pesada se expresen de forma secuencial, separando así temporalmente la producción de las cadenas ligera y pesada; y b) permitir el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada para formar el anticuerpo funcional o fragmento del mismo.

En una realización adicional, el sistema de expresión de *Pseudomonas* puede expresar fragmentos Fab terapéuticos humanos de una sola cadena, o anticuerpos de cadena completa o porciones de los mismos, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂-cremallera de leucina, Fv, dsFv, anticuerpo anti-CD18, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o los descritos en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3 - Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

Anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Nefritis

ES 2 707 786 T3

Anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Indicación
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Psoriasis
AD-159	gp120	Humanizado		HIV
AD-439	gp120	Humanizado		HIV
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Esclerosis múltiple
Anti-CD 11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Psoriasis
Anti-CD 18	CD18	Humanizado	Fab'2	Infarto de miocardio
Anti-LFAI	CD18	Murino	Fab'2	Rechazo de aloinjerto
Anti-VEGF	VEGF	Humanizado	IgG1	Cancer (general)
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	SLE
BEC2	anti-Id	Murino	IgG	Pulmón
BIRR-1	ICAM-1	Murino	IgG2a	Accidente cerebrovascular
BTI-322	CD2	Rata	IgG	GvHD
C225	EGFR	Quimérico	IgG	Cabeza + Cuello
CAT-152	TGF-beta 2	Humano		Cirugía de glaucoma
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectina	Humanizado		Psoriasis

Anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Indicación
Corsevin M	Factor VII	Quimérico		Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		Artritis reumatoide
Herceptina	Her2/neu	Humanizado	IgG1	Cáncer de mama metastásico
HNK20	F gp	Murino	IgA	RSV
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	Accidente cerebrovascular
IC14	CD14	---		Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		Asma/Alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Enfermedad de Crohn
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Accidente cerebrovascular
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Rechazo de aloinjerto
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Colitis ulcerosa
LDP-03/Campath1H	CD52	Humanizado	IgG1	CLL
Lym-1	HLA DR	Quimérico		NHL
LympoCide	CD22	Humanizado		NHL
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Artritis reumatoide
MEDI-500	TCR alfa beta	Murino	IgM	GvHD

ES 2 707 786 T3

Anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Indicación
MEDI-507	CD2	Humanizado		Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Enfermedad autoinmune
OrthoClone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2 a	Rechazo de aloinjerto
Ostavir	Hep B	Humano		Hep B
OvaRex	CA 125	Murino		Ovario
Panorex 17-1A	EpCAM	Murino	IgG2a	Colorrectal
PRO542	gp120	Humanizado		HIV
Protovir	CMV	Humanizado	IgG1	CMV
RepPro/Abc iximab	gpIIbIIIa	Quimérico	Fab	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Asma/Alergia
Rituxan	CD20	Quimérico	IgG1	NHL
SB-240563	IL5	Humanizado		Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Psoriasis
SMART M195	CD33	Humanizado	IgG	AML
SMART 1D10	HLA	----		NHL
Synagis	F gp	Humanizado	IgG1	RSV (Pediátrico)
Vitaxin	VNRintegrina	Humanizado		Sarcoma

Anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Indicación
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Rechazo de aloinjerto

Producción de factores transcripcionales

5 Para referencia, se divulga la producción de factores de transcripción recombinantes de mamífero por una célula huésped de la especie *Pseudomonas fluorescens*. Después de la expresión de la proteína, puede aislarse la proteína. Puede purificarse la proteína. Opcionalmente, la proteína puede renaturalizarse para producir una proteína activa. En otra realización, se describe una célula huésped de la especie *Pseudomonas* que se ha transformado para expresar un factor de transcripción recombinante de mamífero.

10 Los factores de transcripción adecuados para la inserción en los sistemas de expresión descritos aquí incluyen los de la familia de hélice-giro-hélice y los miembros de la familia Pac, así como otras familias de factores de transcripción conocidas en la técnica. Los miembros de estas familias, adecuados para uso con la presente invención, incluyen mamíferos y homólogos de mamíferos y análogos de: reguladores transcripcionales; factores de transcripción de la familia ASNC tales como ASNC_trans_reg, reguladores transcripcionales putativos; proteínas reguladoras bacterianas de la familia luxR; factores de transcripción de hélice-giro-hélice reguladores bacterianos; proteínas reguladoras bacterianas de la familia arsR; factores de transcripción del dominio hélice-giro-hélice, especialmente la familia rpiR; factores de transcripción de proteínas reguladoras bacterianas, factores de transcripción hélice-giro-hélice reguladores bacterianos; factores de transcripción de dominio de unión a ADN; familia MarR de factores de transcripción; la familia ROK de factores de transcripción; la familia MerR de proteínas reguladoras; factores de transcripción del represor de arginina; factores transcripcionales de firmicute; factores de transcripción reguladores de absorción férrica; factores de transcripción sigma; factores de transcripción del receptor regulador de respuesta; factores de transcripción de la proteína atenuante de unión al ARN de triptófano; factores de transcripción putativos de dominio de unión a azúcar; factores de transcripción del dominio PRD; factores de transcripción de la proteína reguladora del nitrógeno; reguladores negativos de la competencia genética, tales como MecA; factores de transcripción del regulador transcripcional negativo; factores de transcripción del regulador transcripcional bacteriano; factores de transcripción sensibles a glicerol-3-fosfato; factores de transcripción represores dependientes de hierro; y numerosos factores de transcripción reguladores transcripcionales específicos de la especie.

Los factores de transcripción expresados por la especie de *Pseudomonas* se pueden utilizar para aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas y de investigación.

Preparación del vector

30 Polinucleótidos

Las proteínas y péptidos recombinantes de mamífero pueden expresarse a partir de polinucleótidos en los que la secuencia codificante del polipéptido objetivo está operativamente unida a los elementos reguladores de transcripción y traducción que forman un gen funcional a partir del cual la célula huésped puede expresar la proteína. La secuencia de codificación puede ser una secuencia de codificación nativa para el polipéptido objetivo, si está disponible, pero también puede ser una secuencia de codificación que se ha seleccionado, mejorado u optimizado para su uso en la célula huésped de expresión seleccionada: por ejemplo, sintetizando el gen para reflejar el sesgo de uso del codón de una especie de *Pseudomonas* tales como *P. fluorescens*. El gen o los genes resultantes se habrán construido dentro de o se insertarán en uno o más vectores, que luego se transformarán en la célula huésped de expresión. Se dice que el ácido nucleico o un polinucleótido que se proporciona en una "forma expresable" significa ácido nucleico o un polinucleótido que contiene al menos un gen que puede expresarse mediante la célula huésped de expresión bacteriana seleccionada.

Elementos reguladores

45 Los elementos reguladores usados en este documento pueden unirse operativamente al gen que codifica la proteína recombinante de mamífero objetivo. La secuencia codificante del gen que codifica la proteína usada en la presente memoria puede contener, además de la secuencia codificante del polipéptido maduro y elementos reguladores de la transcripción, elementos codificantes adicionales, por ejemplo, una o más secuencias codificantes para etiquetas peptídicas, prepéptidos, propéptidos, pre-pro-péptidos u otros elementos de codificación comúnmente utilizados conocidos en la técnica, excluyendo los péptidos señal de secreción funcionales en la célula huésped de expresión seleccionada.

50 El término "unido operativamente", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier configuración en la que los elementos reguladores transcripcionales y de traducción están unidos covalentemente a la secuencia codificante en dicha o dichas disposiciones, con respecto a la secuencia codificante, que los elementos reguladores

pueden dirigir la expresión de la secuencia de codificación. En una realización, los elementos reguladores serán parte de un gen completo antes de sufrir la transformación en una célula huésped; sin embargo, en otras realizaciones, los elementos reguladores son parte de otro gen, que puede ser parte del genoma del huésped o puede ser parte de un genoma de otro organismo, o puede derivarse de él.

5 Promotores y elementos accesorios

Los promotores usados de acuerdo con la presente invención pueden ser promotores constitutivos o promotores regulados. Los ejemplos comunes de promotores regulados útiles incluyen los de la familia derivada del promotor lac (es decir, el promotor lacZ), especialmente los promotores tac y trc descritos en la patente de Estados Unidos No. 4.551.433 de DeBoer, así como Ptac16, Ptacl7, Ptacll, PlacUV5, y el promotor T7lac.

- 10 Los ejemplos comunes de promotores de tipo no lac útiles en los sistemas de expresión de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, los enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de promotores no lac

Promotor	Inductor
λP_R	Alta temperatura
λP_L	Alta temperatura
Pm	Benzoatos de alquilo o halo
Pu	Alquil- o halo-toluenos
Psal	Salicilatos

- 15 Véase, por ejemplo: J. Sanchez-Romero y V. De Lorenzo (1999) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (A. Demain & J. Davies, eds.) páginas 460-74 (ASM Press, Washington, D.C.); H. Schweizer (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 439-445; y R. Slater & R. Williams (2000) Molecular Biology and Biotechnology (J. Walker & R. Rapley, eds.) páginas 125-54. Un promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de un promotor nativo para la célula huésped bacteriana seleccionada también puede usarse para controlar la expresión del transgén que codifica el polipéptido objetivo, por ejemplo, un promotor operón de antranilato o benzoato de *Pseudomonas* (Pant, Pben). También se pueden usar promotores en tándem en los que más de un promotor está unido covalentemente a otro, ya sea la misma secuencia o diferente, por ejemplo, un promotor en tándem Pant-Pben (híbrido interpromotor) o un promotor en tándem Plac-Plac.

- 20 Los promotores regulados utilizan proteínas reguladoras del promotor con el fin de controlar la transcripción del gen del cual el promotor es una parte. Cuando se usa aquí un promotor regulado, una proteína reguladora del promotor correspondiente también será parte de un sistema de expresión de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de proteínas reguladoras del promotor incluyen: proteínas activadoras, por ejemplo, proteína activadora del catabolito de *E. coli*, proteína MalT; activadores transcripcionales de la familia AraC; proteínas represoras, por ejemplo, proteínas LacI de *E. coli*; y proteínas reguladoras de doble función, por ejemplo, proteína NagC de *E. coli*. En la técnica se conocen muchos pares de proteína regulados del promotor/promotor-regulador-proteína.

- 25 Las proteínas reguladoras del promotor interactúan con un compuesto efector, es decir, un compuesto que se asocia reversible o irreversiblemente con la proteína reguladora para permitir que la proteína se libere o se una al menos a una región reguladora de la transcripción del ADN del gen que está bajo el control del promotor, permitiendo o bloqueando de ese modo la acción de una enzima transcriptasa para iniciar la transcripción del gen. Los compuestos efectores se clasifican como inductores o correpresores, y estos compuestos incluyen compuestos efectores nativos y compuestos inductores gratuitos. En la técnica se conocen muchos tríos regulados de promotor/promotor-proteína reguladora/compuesto efector. Aunque puede usarse un compuesto efector en todo el cultivo o fermentación celular, en una realización en la que se usa un promotor regulado, después del crecimiento de una cantidad o densidad deseada de biomasa de la célula huésped, se agrega un compuesto efector apropiado al cultivo para que directamente o indirectamente de como resultado la expresión del gen o los genes objetivo deseados.

- 30 A modo de ejemplo, cuando se utiliza un promotor de la familia lac, el gen *lacI* también puede estar presente en el sistema. El gen *lacI*, que es (normalmente) un gen expresado constitutivamente, codifica la proteína represora Lac (proteína LacI) que se une al operador lac de estos promotores. Por lo tanto, cuando se utiliza un promotor de la familia lac, el gen *lacI* también se puede incluir y expresar en el sistema de expresión. En el caso de los miembros

de la familia del promotor lac, por ejemplo, el promotor tac, el compuesto efector es un inductor, tal como un inductor gratuito como IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, también denominado "isopropiltiogalactósido").

Otros elementos

Se pueden incluir otros elementos reguladores en una construcción de expresión. Tales elementos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias potenciadoras de la traducción, otros promotores, activadores, señales de inicio y parada de la traducción, terminadores de la transcripción, reguladores cistrónicos, reguladores policistrónicos, secuencias marcadoras, tales como las "etiquetas" de secuencia de nucleótidos y secuencias codificantes de péptidos "etiqueta", lo que facilita la identificación, separación, purificación o aislamiento de un polipéptido expresado.

Como mínimo, un gen que codifica una proteína de acuerdo con la presente invención puede incluir, además de la secuencia codificante de la proteína de mamífero, los siguientes elementos reguladores ligados operativamente a los mismos: un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), un terminador de transcripción, inicio de traducción y señales de parada. Se pueden obtener RBS útiles de cualquiera de las especies útiles como células huésped en sistemas de expresión, tales como las de la célula huésped seleccionada. Se conocen muchos RBS específicos y una variedad de RBS consenso, por ejemplo, los descritos y referenciados por D. Frishman et al. (1999) Gene 234 (2): 257 - 65; y B.E. Suzek et al. (2001) Bioinformatics 17 (12): 1123-30. Además, pueden usarse RBS nativos o sintéticos, por ejemplo, los descritos en: el documento EP 0207459 (RBS sintéticos); O. Ikehata et al. (1989) Eur. J. Biochem. 181 (3): 563-70 (secuencia de RBS nativa de AAGGAAG). Otros ejemplos de métodos, vectores y elementos de traducción y transcripción, y otros elementos útiles en la presente invención se divulgan, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.055.294 y 5.128.130 de Gilroy et al.; 5.281.532 de RammLer et al.; 4.695.455 y 4.861.595 de Barnes et al.; 4.755.465 de Gray et al.; y 5.169.760 de Wilcox.

Vectores

La transcripción del ADN que codifica las enzimas de la presente invención mediante *Pseudomonas* aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector o plásmido. Los potenciadores típicos son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb de tamaño que actúan sobre el promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen diversos potenciadores de *Pseudomonas*, tal como se divulga en otra parte del presente documento.

Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped de *Pseudomonas*, por ejemplo, los genes de resistencia libres de antibiótico de *P. fluorescens* y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural secuencia abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican las enzimas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con secuencias de inicio y terminación de la traducción, y, en una realización, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la enzima traducida. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una enzima de fusión que incluye un péptido de identificación en el terminal N que imparte características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Vectores de expresión útiles para usar con *P. fluorescens* en la expresión de enzimas se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de inicio y terminación de la traducción adecuadas en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si se desea, proporcionar la amplificación dentro del huésped.

Los vectores son conocidos en la técnica como útiles para expresar proteínas recombinantes en células huésped, y cualquiera de estos puede usarse para expresar los genes de acuerdo con la presente invención. Dichos vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos y vectores de expresión en fagos. Los ejemplos de vectores plasmídicos útiles incluyen, pero sin limitación, los plásmidos de expresión pBBR1MCS, pDSK519, pKT240, pML122, pPS10, RK2, RK6, pRO1600 y RSF1010. Otros ejemplos de tales vectores útiles incluyen los descritos por, por ejemplo, N. Hayase (1994) Appl. Envir. Microbiol. 60(9): 3336-42; A.A. Lushnikov et al. (1985) Basic Life Sci. 30: 657-62; S. Graupner & W. Wackernagel (2000) Biomolec. Eng. 17(1): 11-16; H.P. Schweizer (2001) Curr. Opin. Biotech. 12(5): 439-45; M. Bagdasarian & K.N. Timmis (1982) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 47-67; T. Ishii et al., (1994) FEMS Microbiol. Lett. 116(3): 307-13; I.N. Olekhovich & Y.K. Fomichev (1994) Gene 140(1): 63-65; M. Tsuda & T. Nakazawa (1993) Gene 136(1-2): 257-62; C. Nieto et al. (1990) Gene 87(1): 145-49; J.D. Jones & N. Gutterson (1987) Gene 61(3): 299-306; M. Bagdasarian et al., (1981) Gene 16(1-3): 237-47; H.P. Schweizer et al., (2001) Genet. Eng. (NY) 23: 69-81; P. Mukhopadhyay et al., (1990) J. Bact. 172(1): 477-80; D.O. Wood et al., (1981) J. Bact. 145(3): 1448-51; y R. Holtwick et al., (2001) Microbiology 147(Pt 2): 337-44.

Otros ejemplos de vectores de expresión que pueden ser útiles en células huésped de *Pseudomonas* incluyen los enumerados en la Tabla 5 como derivados de los replicones indicados.

Tabla 5. Algunos ejemplos de vectores de expresión útiles

Replicón	Vectores
pPS10	pCN39, pCN51
RSF1010	pKT261-3
	pMMB66EH
	pEB8
	pPLGN1
	pMYC1050
RK2/RP1	pRK415
	pJB653
pRO1600	pUCP
	pBSP

El plásmido de expresión, RSF1010, es descrito, por ejemplo, por F. Heffron et al. (1975) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 72 (9): 3623 - 27, y por K. Nagahari y K. Sakaguchi (1978) J. Bact. 133 (3): 1527-29. El plásmido RSF1010 y sus derivados son vectores particularmente útiles en la presente invención. Ejemplos de derivados útiles de RSF1010, que son conocidos en la técnica, incluyen, por ejemplo, PKT212, pKT214, pKT231 y plásmidos relacionados, y pMYC1050 y plásmidos relacionados (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos 5.527.883 y 5.840.554 de Thompson et al.), tales como, por ejemplo, pMYC1803. El plásmido pMYC1803 se deriva del plásmido pTJS260 basado en RSF1010 (véase la patente de Estados Unidos No. 5.169.760 de Wilcox), que porta un marcador regulado de resistencia a tetraciclina y los loci de replicación y movilización del plásmido RSF1010. Otros ejemplos de vectores útiles incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 4.680.264 de Puhler et al.

En una realización, se usa un plásmido de expresión como el vector de expresión. En otra realización, RSF1010 o un derivado del mismo se usa como el vector de expresión. En aún otra realización, se usa pMYC1050 o un derivado del mismo, o pMYC1803 o un derivado del mismo, como el vector de expresión.

El plásmido se puede mantener en la célula huésped mediante el uso de un gen marcador de selección, también presente en el plásmido. Este puede ser un gen o genes de resistencia a antibióticos, en cuyo caso se añadirán el o los antibióticos correspondientes al medio de fermentación, o cualquier otro tipo de gen marcador de selección conocido como útil en la técnica, por ejemplo, un gen restaurador de prototrofia en cuyo caso el plásmido se usará en una célula huésped que es auxotrófica para el rasgo correspondiente, por ejemplo, un rasgo biocatalítico tal como una biosíntesis de aminoácidos o un rasgo de biosíntesis de nucleótidos o un rasgo de utilización de fuente de carbono.

La amplia información de secuencia requerida para la genética molecular y las técnicas de ingeniería genética está ampliamente disponible públicamente. El acceso a secuencias completas de nucleótidos de mamífero, así como de secuencias de ADNc de genes humanos, secuencias de aminoácidos y genomas se puede obtener del GenBank en la dirección URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>. También se puede obtener información adicional de GeneCards, una enciclopedia electrónica que integra información sobre genes y sus productos y aplicaciones biomédicas del Weizmann Institute of Science Genome and Bioinformatics (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/>), la información de secuencias de nucleótidos también se puede obtener de la Base de Datos de Secuencias de Nucleótidos EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) o del Banco de Datos de ADN del Japón (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>); sitios adicionales para información sobre secuencias de aminoácidos incluyen el sitio web de recursos de información sobre proteínas de Georgetown (<http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) y Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/sprot-top.html>).

Transformación

La transformación de las células huésped de *Pseudomonas* con el vector o los vectores se puede realizar usando cualquier metodología de transformación conocida en la técnica, y las células huésped bacterianas se pueden transformar como células intactas o como protoplastos (es decir, que incluyen citoplastos). Los ejemplos de metodologías de transformación incluyen metodologías de poración, por ejemplo, electroporación, fusión de protoplastos, conjugación bacteriana y tratamiento de catión divalente, por ejemplo, tratamiento con cloruro de calcio o tratamiento con $\text{CaCl}_2/\text{Mg}^{2+}$ u otros métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison (1977) J. Bact. 132: 349 - 351; Clark-Curtiss & Curtiss (1983) Methods in Enzymology 101: 347-362, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed.); Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual; y Ausubel et al., eds. (1994) Current Protocols in Molecular Biology.

Organismos *Pseudomonas*

Aunque en la presente invención se usa *Pseudomonas*, particularmente *Pseudomonas fluorescens*, otras *Pseudomonas* y organismos bacterianos estrechamente relacionados se describen en la presente memoria. Las *Pseudomonas* y las bacterias estrechamente relacionadas son generalmente parte del grupo definido como "Subgrupo 1 de proteobacterias Gram (-)" o "Bacilos y cocos aeróbicos Gram negativos" (Buchanan y Gibbons (eds.) (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, págs. 217-289).

Tabla 6. "Bacilos y cocos aeróbicos Gram negativos" (Bergey (1974))

Familia I. Pseudomonadaceae	<i>Gluconobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Zoogloea</i>
Familia II. Azotobacteraceae	<i>Azomonas</i> <i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>
Familia III. Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i> <i>Rhizobium</i>
Familia IV. Metilomonadaceae	<i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i>
Familia V. Halobacteriaceae	<i>Halobacterium</i> <i>Halococcus</i>
Otros Géneros	<i>Acetobacter</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bordetella</i> <i>Brucella</i> <i>Francisella</i> <i>Thermus</i>

El "Subgrupo 1 de Proteobacterias Gram negativas" también incluye Proteobacterias que se clasificarían en este encabezado de acuerdo con los criterios utilizados en la clasificación. El encabezado también incluye grupos que anteriormente se clasificaron en esta sección pero que ya no existen, como los géneros *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Hydrogenophaga*, *Oceanimonas*, *Ralstonia* y *Stenotrophomonas*, el género *Sphingomonas* (y el

género *Blastomonas*, derivado del mismo), que fue creado por reagrupación de organismos pertenecientes a (y anteriormente llamadas especies de) el género *Xanthomonas*, el género *Acidomonas*, que se creó reagrupando organismos pertenecientes al género *Acetobacter* como se define en Bergey (1974). Además, los huéspedes pueden incluir células del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas enalia* (ATCC 14393), *Pseudomonas nigrificiens* (ATCC 19375) y *Pseudomonas putrefaciens* (ATCC 8071), que se han reclasificado respectivamente como *Alteromonas haloplanktis*, *Alteromonas nigrificiens* y *Alteromonas putrefaciens*. Similarmente, por ejemplo, *Pseudomonas acidovorans* (ATCC 15668) y *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) desde entonces se han reclasificado como *Comamonas acidovorans* y *Comamonas testosteroni*, respectivamente; y *Pseudomonas nigrificiens* (ATCC 19375) y *Pseudomonas piscicida* (ATCC 15057) han sido reclasificados, respectivamente, como *Pseudoalteromonas nigrificiens* y *Pseudoalteromonas piscicida*. El "Subgrupo 1 de Proteobacterias Gram negativas" también incluye Proteobacterias clasificadas como pertenecientes a cualquiera de las familias: *Pseudomonadaceae*, *Azotobacteraceae* (ahora a menudo llamada por el sinónimo, el "grupo Azotobacter" de *Pseudomonadaceae*), *Rhizobiaceae* y *Methylomonadaceae* (ahora a menudo llamado por el sinónimo, "Methylococcaceae"). En consecuencia, además de los otros géneros descritos en la presente memoria, otros géneros Proteobacterianos que caen dentro del "Subgrupo 1 de Proteobacterias Gram negativas" incluyen: 1) bacterias del grupo Azotobacter del género *Azorhizophilus*; 2) bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* de los géneros *Cellvibrio*, *Oligella* y *Teredinibacter*; 3) bacterias de la familia *Rhizobiaceae* de los géneros *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Liberibacter* (también llamado "*Candidatus Liberibacter*") y *Sinorhizobium*; y 4) bacterias de la familia *Methylococcaceae* de los géneros *Metilobacter*, *Methylocaldum*, *Methylomicrobium*, *Methylোসarcina* y *Methylosphaera*.

También se divulga aquí una célula huésped seleccionada del "Subgrupo 2 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 2 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros (con el número total de cepas depositadas catalogadas en catálogo, públicamente disponibles, indicadas entre paréntesis, todas depositadas en ATCC, excepto que se indique lo contrario): *Acidomonas* (2); *Acetobacter* (93); *Gluconobacter* (37); *Brevundimonas* (23); *Beijerinckia* (13); *Derrxia* (2); *Brucella* (4); *Agrobacterium* (79); *Chelatobacter* (2) *Ensifer* (3); *Rhizobium* (144); *Sinorhizobium* (24); *Blastomonas* (1); *Sphingomonas* (27) *Alcaligenes* (88); *Bordetella* (43); *Burkholderia* (73); *Ralstonia* (33); *Acidovorax* (20) *Hydrogenophaga* (9); *Zoogloea* (9); *Methylobacter* (2); *Methylocaldum* (1 en NCIMB); *Methylococcus* (2); *Methylomicrobium* (2); *Methylomonas* (9); *Methylোসarcina* (1) *Methylosphaera*; *Azomonas* (9); *Azorhizophilus* (5); *Azotobacter* (64); *Cellvibrio* (3); *Oligella* (5); *Pseudomonas* (1139); *Francisella* (4); *Xanthomonas* (229); *Stenotrophomonas* (50); y *Oceanimonas* (4).

Los ejemplos de especies de células huésped del "Subgrupo 2 de Proteobacterias Gram negativas" incluyen, pero no se limitan a, las siguientes bacterias (con la ATCC u otros números de depósito de ejemplos de cepas de las mismas mostradas entre paréntesis): *Acidomonas methanolica* (ATCC 43581); *Acetobacter acetii* (ATCC 15973); *Gluconobacter oxydans* (ATCC 19357); *Brevundimonas diminuta* (ATCC 11568); *Beijerinckia indica* (ATCC 9039 y ATCC 19361); *Derrxia gummosa* (ATCC 15994); *Brucella melitensis* (ATCC 23456), *Brucella abortus* (ATCC 23448); *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 23308), *Agrobacterium radiobacter* (ATCC 19358), *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 11325); *Chelatobacter heintzii* (ATCC 29600); *Ensifer adhaerens* (ATCC 33212); *Rhizobium leguminosarum* (ATCC 10004); *Sinorhizobium fredii* (ATCC 35423); *Blastomonas natatoria* (ATCC 35951); *Sphingomonas paucimobilis* (ATCC 29837); *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750); *Bordetella pertussis* (ATCC 9797); *Burkholderia cepacia* (ATCC 25416); *Ralstonia pickettii* (ATCC 27511); *Acidovorax facilis* (ATCC 11228); *Hydrogenophaga flava* (ATCC C 33667); *Zoogloea ramigera* (ATCC 19544); *Methylobacter luteus* (ATCC 49878); *Methylocaldum gregile* (NCIMB 11912); *Methylococcus capsulatus* (ATCC 19069); *Methylomicrobium agile* (ATCC 35068); *Methylomonas methanica* (ATCC 35067); *Methylোসarcina fibrata* (ATCC 700909); *Methylosphaera hansonii* (ACAM 549); *Azomonas agilis* (ATCC 7494); *Azorhizophilus paspali* (ATCC 23833); *Azotobacter chroococcum* (ATCC 9043); *Cellvibrio mixtus* (UQM 2601); *Oligella urethralis* (ATCC 17960); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145);), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 35858), *Francisella tularensis* (ATCC 6223), *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637), *Xanthomonas campestris* (ATCC 33913); y *Oceanomonas doudoroffii* (ATCC 27123).

También se divulga aquí una célula huésped seleccionada del "Subgrupo 3 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 3 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros: *Brevundimonas*; *Agrobacterium*; *Rhizobium*; *Sinorhizobium*; *Blastomonas*; *Sphingomonas*; *Alcaligenes*; *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Hydrogenophaga*; *Methylobacter*; *Methylocaldum*; *Methylococcus*; *Metilomicrobium*; *Methylomonas*; *Methylোসarcina*; *Methylosphaera*; *Azomonas*; *Azorhizophilus*; *Azotobacter*; *Cellvibrio*; *Oligella*; *Pseudomonas*; *Teredinibacter*; *Francisella*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas* y *Oceanimonas*.

También se divulga aquí una célula huésped seleccionada del "Subgrupo 4 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 4 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros: *Brevundimonas*; *Blastomonas*; *Sphingomonas*; *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Hydrogenophaga*; *Methylobacter*; *Methylocaldum*; *Methylococcus*; *Metilomicrobium*; *Methylomonas*; *Methylোসarcina*; *Methylosphaera*; *Azomonas*; *Azorhizophilus*; *Azotobacter*; *Cellvibrio*; *Oligella*; *Pseudomonas*; *Teredinibacter*; *Francisella*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas*; y *Oceanimonas*.

También se divulga aquí, una célula huésped seleccionada del "Subgrupo 5 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 5 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros: *Methylobacter*; *Methylocaldum*; *Methylococcus*; *Metilomicrobium*; *Methylomonas*; *Methylোসarcina*;

Methylosphaera; *Azomonas*; *Azorhizophilus*; *Azotobacter*; *Cellvibrio*; *Oligella*; *Pseudomonas*; *Teredinibacter*; *Francisella*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas*; y *Oceanimonas*.

La célula huésped se puede seleccionar del "Subgrupo 6 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 6 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros:

5 *Brevundimonas*; *Blastomonas*; *Sphingomonas*; *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Hydrogenophaga*; *Azomonas*; *Azorhizophilus*; *Azotobacter*; *Cellvibrio*; *Oligella*; *Pseudomonas*; *Teredinibacter*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas*; y *Oceanimonas*.

La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 7 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 7 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros:

10 *Azomonas*; *Azorhizophilus*; *Azotobacter*; *Cellvibrio*; *Oligella*; *Pseudomonas*; *Teredinibacter*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas*; y *Oceanimonas*.

La célula huésped se puede seleccionar de "Subgrupo 8 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 8 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros:

15 *Brevundimonas*; *Blastomonas*; *Sphingomonas*; *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Hydrogenophaga*; *Pseudomonas*; *Stenotrophomonas*; *Xanthomonas*; y *Oceanimonas*.

La célula huésped se puede seleccionar del "Subgrupo 9 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 9 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros:

Brevundimonas; *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Hydrogenophaga*; *Pseudomonas*; *Stenotrophomonas* y *Oceanimonas*.

La célula huésped se puede seleccionar del "Subgrupo 10 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 10 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros:

20 *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Pseudomonas*; *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*.

La célula huésped se puede seleccionar del "Subgrupo 11 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 11 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los géneros: *Pseudomonas*;

25 *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 12 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 12 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros: *Burkholderia*; *Ralstonia*; *Pseudomonas*. La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 13 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 13 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de los siguientes géneros: *Burkholderia*; *Ralstonia*;

30 *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 14 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 14 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias de los siguientes géneros: *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 15 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 15 de proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de las Proteobacterias del género *Pseudomonas*.

La célula huésped puede seleccionarse de "Subgrupo 16 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 16 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias de las siguientes especies de *Pseudomonas* (con la ATCC u otros números de depósito de la (s) cepa (s) ejemplar (es) mostradas entre paréntesis): *P. abietaniphila* (ATCC 700689); *P. aeruginosa* (ATCC 10145); *P. alcaligenes* (ATCC 14909); *P. anguilliseptica* (ATCC 33660); *P. citronelolis* (ATCC 13674); *P. flavescens* (ATCC 51555); *P. mendocina* (ATCC 25411); *P. nitroreducens* (ATCC 33634); *P. oleovorans* (ATCC 8062); *P. pseudoalcaligenes* (ATCC 17440); *P. resinovorans* (ATCC 14235); *P. straminea* (ATCC 33636); *P. agarici* (ATCC 25941); *P. alcaliphila*; *P. alginovora*; *P. andersonii*; *P. asplenii* (ATCC 23835); *P. azelaica* (ATCC 27162); *P. beijerinckii* (ATCC 19372); *P. borealis*; *P. boreopolis* (ATCC 33662); *P. brassicacearum*; *P. butanovora* (ATCC 43655); *P. cellulosa* (ATCC 55703); *P. aurantiaca* (ATCC 33663); *P. chlororaphis* (ATCC 9446, ATCC 13985, ATCC 17418, ATCC 17461); *P. fragi* (ATCC 4973); *P. lundensis* (ATCC 49968); *P. taetrolens* (ATCC 4683); *P. cissicola* (ATCC 33616); *P. coronafaciens*; *P. diterpeniphila*; *P. elongata* (ATCC 10144); *P. flectens* (ATCC 12775); *P. azotoformans*; *P. brenneri*; *P. cedrella*; *P. corrugata* (ATCC 29736); *P. extremorientalis*; *P. fluorescens* (ATCC 35858); *P. gessardii*; *P. libanensis*; *P. mandelii* (ATCC 700871); *P. marginalis* (ATCC 10844); *P. migulae*; *P. mucidolens* (ATCC 4685); *P. orientalis*; *P. rhodesiae*; *P. synxantha* (ATCC 9890); *P. tolaasii* (ATCC 33618); *P. veronii* (ATCC 700474); *P. frederiksbergensis*; *P. geniculata* (ATCC 19374); *P. gingeri*; *P. graminis*; *P. grimmii*; *P. halodenitrificans*; *P. halophila*; *P. hibiscicola* (ATCC 19867); *P. huttiensis* (ATCC 14670); *P. hydrogenovora*; *P. jessenii* (ATCC 700870); *P. kilonensis*; *P. lanceolata* (ATCC 14669); *P. lini*; *P. marginata* (ATCC 25417); *P. mephitica* (ATCC 33665); *P. denitrificans* (ATCC 19244); *P. pertucinogena* (ATCC 190); *P. pictorum* (ATCC 23328); *P. psychrophila*; *P. fulva* (ATCC 31418); *P. montellii* (ATCC 700476); *P. mosselii*; *P. oryzihabitans* (ATCC 43272); *P. plecoglossicida* (ATCC 700383); *P. putida* (ATCC 12633); *P. reactans*; *P. spinosa* (ATCC 14606); *P. balearica*; *P. luteola* (ATCC 43273); *P. stutzeri* (ATCC 17588); *P. amygdali* (ATCC 33614); *P. avellanae* (ATCC 700331); *P. caricapapayae* (ATCC 33615); *P. cichorii* (ATCC 10857); *P. ficuserectae* (ATCC 35104); *P. fuscovaginae*; *P. meliae* (ATCC 33050); *P. syringae* (ATCC 19310); *P. viridiflava* (ATCC 13223); *P. termocarboxydovorans* (ATCC 35961); *P. termotolerans*; *P. thivervalensis*; *P. vancouverensis* (ATCC 700688); *P. wisconsinensis*; y *P. xiamenensis*.

La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 17 de Proteobacterias Gram negativas". El "Subgrupo 17 de Proteobacterias Gram negativas" se define como el grupo de Proteobacterias conocido en la técnica como las "*Pseudomonas fluorescens*" que incluyen aquellas que pertenecen, por ejemplo, a las siguientes especies de *Pseudomonas*: *P. azotoformans*; *P. brenneri*; *P. cedrella*; *P. corrugata*; *P. extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens*; *P. gessardii*; *P. libanensis*; *Pseudomonas mandelii*; *P. marginalis*; *P. migulae*; *P. mucidolens*; *P. orientalis*; *P. rhodesiae*; *P. synxantha*; *P. tolaasii*; y *P. veronii*.

La célula huésped puede seleccionarse del "Subgrupo 18 de Proteobacterias Gram (-)". El "Subgrupo 18 de Proteobacterias Gram (-)" se define como el grupo de todas las subespecies, variedades, cepas y otras unidades secundarias especiales de la especie *P. fluorescens*, que incluyen las que pertenecen, por ejemplo, a lo siguiente (con la ATCC u otros números de depósito de los ejemplos de cepas mostradas entre paréntesis): *P. fluorescens* biotipo A, también llamado biovar 1 o biovar I (ATCC 13525); *P. fluorescens* biotipo B, también llamado biovar 2 o biovar II (ATCC 17816); *P. fluorescens* biotipo C, también llamado biovar 3 o biovar III (ATCC 17400); *P. fluorescens* biotipo F, también llamado biovar 4 o biovar IV (ATCC 12983); *P. fluorescens* biotipo G, también llamado biovar 5 o biovar V (ATCC 17518); *P. fluorescens* biovar VI; *P. fluorescens* Pf0-1; *P. fluorescens* Pf-5 (ATCC BAA-477); *P. fluorescens* SBW25; y *P. fluorescens* subespecie *cellulosa* (NCIMB 10462).

La célula huésped puede seleccionarse de "Subgrupo 19 de Proteobacterias Gram (-)". El "Subgrupo 19 de Proteobacterias Gram (-)" se define como el grupo de todas las cepas de *P. fluorescens* biotipo A. Una cepa particular de este biotipo es *P. fluorescens* cepa MB101 (véase la patente de Estados Unidos No. 5.169.760 de Wilcox) y sus derivados. Un ejemplo de un derivado del mismo es *P. fluorescens* cepa MB214, construido insertando en el locus cromosómico *asd* de MB101 (gen de aspartato deshidrogenasa), una construcción *PlacI-lacI-lacZYA* de *E. coli* nativa (es decir, en la que se eliminó *PlacZ*).

También se divulga aquí una célula huésped de cualquiera de las Proteobacterias del orden Pseudomonadales. En una realización particular, la célula huésped es cualquiera de las Proteobacterias de la familia *Pseudomonadaceae*.

Cepas adicionales de *P. fluorescens* que se pueden usar en la presente invención incluyen *P. fluorescens* Migula y *P. fluorescens* Loitokitok, que tiene las siguientes designaciones ATCC: (NCB 8286); NRRL B-1244; NCIB 8865 cepa CO1; NCIB 8866 cepa CO2; 1291 (ATCC 17458; IFO 15837; NCIB 8917; LA; NRRL B-1864; pirrolidina; PW2 (ICMP 3966; NCPPB 967; NRRL B-899); 13475; NCTC 10038; NRRL B-1603 (6; IFO 15840); 52-1C; CCEB 488-A (BU 140); CCEB 553 OEM 15/47; IAM 1008 (AHH-27); LAM 1055 (AHH-23); 1 (IFO 15842); 12 (ATCC 25323; NIH 11; den Dooren de Jong 216); 18 (IFO 15833; WRRL P-7); 93 (TR-10); 108 (52-22; IFO 15832); 143 (IFO 15836; PL); 149 (2-40-40; IFO 15838); 182 (IFO 3081; PJ 73); 184 (IFO 15830); 185 (W2 L-1); 186 (IFO 15829; PJ 79); 187 (NCPBP 263); 188 (NCPBP 316); 189 (PJ227; 1208); 191 (IFO 15834; PJ 236; 22/1); 194 (Klinge R-60; PJ 253); 196 (PJ 288); 197 (PJ 290); 198 (PJ 302); 201 (PJ 368); 202 (PJ 372); 203 (PJ 376); 204 (IFO 15835; PJ 682); 205 (PJ 686); 206 (PJ 692); 207 (PJ 693); 208 (PJ 722); 212 (PJ 832); 215 (PJ 849); 216 (PJ 885); 267 (B-9); 271 (B-1612); 401 (C71A; IFO 15831; PJ 187); NRRL B-3178 (4; IFO 15841); KY 8521; 3081; 30-21; (IFO 3081); NORTE; PYR; PW; D946-B83 (BU 2183; FERM-P 3328); P-2563 (FERM-P 2894; IFO 13658); IAM-1126 (43F); M-1; A506 (A5-06); A505 (A5-05-1); A526 (A5-26); B69; 72; NRRL B-4290; PMW6 (NCIB 11615); SC 12936; A1 (IFO 15839); F1847 (CDC-EB); F1848 (CDC 93); NCLB 10586; P17; F-12; AmMS 257; PRA25; 6133D02; 6519E01; NI; SC15208; BNL-WVC; NCTC 2583 (NCIB 8194); H13; 1013 (ATCC 11251; CCEB 295); IFO 3903; 1062; o Pf-5.

Fermentación

El término "fermentación" incluye tanto realizaciones en las que se emplea la fermentación literal como realizaciones en las que se emplean otros modos de cultivo no fermentativos. La fermentación se puede realizar a cualquier escala. En una realización, el medio de fermentación se puede seleccionar entre medios ricos, medios mínimos y medios de sales minerales; se puede usar un medio enriquecido, pero normalmente se evita. En otra realización, se selecciona un medio mínimo o un medio de sales minerales. En otra realización más, se selecciona un medio mínimo.

Los medios de sales minerales consisten en sales minerales y una fuente de carbono tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa o glicerol. Los ejemplos de medios de sales minerales incluyen, por ejemplo, medio M9, medio de *Pseudomonas* (ATCC 179), medio Davis y Mingioli (véase, BD Davis y ES Mingioli (1950) J. Bact. 60: 17-28). Las sales minerales utilizadas para fabricar sales minerales incluyen aquellas seleccionadas entre, por ejemplo, fosfatos de potasio, sulfato o cloruro de amonio, sulfato o cloruro de magnesio y minerales traza tales como cloruro de calcio, borato y sulfatos de hierro, cobre, manganeso y zinc. Típicamente, no se incluye una fuente de nitrógeno orgánico, como peptona, triptona, aminoácidos o un extracto de levadura, en un medio de sales minerales. En cambio, se usa una fuente de nitrógeno inorgánico y esta puede seleccionarse entre, por ejemplo, sales de amonio, amoníaco acuoso y amoníaco gaseoso. Un medio de sales minerales típicamente contendrá glucosa como fuente de carbono. En comparación con los medios de sales minerales, los medios mínimos también pueden contener sales minerales y una fuente de carbono, pero se pueden complementar, por ejemplo, con bajos niveles de aminoácidos, vitaminas, peptonas u otros ingredientes, aunque estos se agregan en niveles muy mínimos.

En una realización, los medios se pueden preparar usando los componentes enumerados en la Tabla 7 a continuación. Los componentes se pueden agregar en el siguiente orden: primero se pueden disolver (NH₄)HPO₄,

5 KH_2PO_4 y ácido cítrico en aproximadamente 30 litros de agua destilada; luego se puede agregar una solución de oligoelementos, seguido de la adición de un agente antiespumante, tal como Ucolub N 115. Luego, después de la esterilización con calor (tal como a aproximadamente 121°C), se pueden añadir soluciones estériles de glucosa MgSO_4 y tiamina-HCL. El control del pH a aproximadamente 6,8 se puede lograr usando amoníaco acuoso. Luego, se puede agregar agua destilada estéril para ajustar el volumen inicial a 371 menos la reserva de glicerol (123 mL). Los productos químicos están disponibles comercialmente de varios proveedores, tales como Merck. Este medio puede permitir un cultivo de alta densidad celular (HCDC) para el crecimiento de especies de *Pseudomonas* y bacterias relacionadas. El HCDC puede comenzar como un proceso por lotes que es seguido por un cultivo de lote alimentado en dos fases. Después de un crecimiento ilimitado en la parte del lote, el crecimiento puede controlarse a una tasa de crecimiento específica reducida durante un período de 3 veces de duplicación en el que la concentración de biomasa puede aumentar varias veces. Más detalles de tales procedimientos de cultivo son descritos por Riesenber, D et al. (1991) "High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate" J Biotechnol 20 (1): 17-27.

Tabla 7: Composición del medio

Componente	Concentración inicial
KH_2PO_4	$13,3 \text{ g L}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$4,0 \text{ g L}^{-1}$
Ácido cítrico	$1,7 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,2 \text{ g L}^{-1}$
Solución de trazas de metal	10 mL L^{-1}
Tiamina HCl	$4,5 \text{ mg L}^{-1}$
Glucosa- H_2O	$27,3 \text{ g L}^{-1}$
Antiespumante Ucolub N115	$0,1 \text{ mL L}^{-1}$
Solución alimentadora	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$19,7 \text{ g L}^{-1}$
Glucosa- H_2O	770 g L^{-1}
NH_3	23 g
Solución de trazas de metal	
Citrato de Fe(III)	6 g L^{-1}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \text{ g L}^{-1}$
$\text{ZnCH}_2\text{COO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,8 \text{ g L}^{-1}$
H_3BO_3	$0,3 \text{ g L}^{-1}$

Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 g L ⁻¹
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,25 g L ⁻¹
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,15 g L ⁻¹
etileno	0,84 g L ⁻¹
ácido dinitrilo-tetraacético Na ₂ ·2H ₂ O (Tritriplex III, Merck)	

El sistema de expresión de acuerdo con la presente invención se puede cultivar en cualquier formato de fermentación. Por ejemplo, los modos de fermentación discontinua, discontinua alimentada, semicontinua y continua pueden emplearse aquí.

- 5 Los sistemas de expresión de acuerdo con la presente invención son útiles para la expresión de transgenes a cualquier escala (es decir, volumen) de fermentación. Por lo tanto, se pueden usar, por ejemplo, volúmenes de fermentación a escala de microlitros, a escala de centilitros y de decilitros; y se puede usar una escala de 1 litro y volúmenes de fermentación más grandes. En una realización, el volumen de fermentación será igual o superior a 1 litro. En otra realización, el volumen de fermentación será igual o superior a 5 Litros, 10 Litros, 15 Litros, 20 Litros, 25 Litros, 50 Litros, 75 litros, 100 Litros, 200 Litros, 500 Litros, 1.000 Litros, 5.000 Litros, 10.000 Litros o 50.000 Litros.

En la presente invención, el crecimiento, cultivo y/o fermentación de las células huésped transformadas se realiza dentro de un intervalo de temperatura que permite la supervivencia de las células huésped, tal como una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4°C a aproximadamente 55°C, inclusive. Además, el "crecimiento" se usa para indicar los estados biológicos de la división celular activa y/o la ampliación, así como los estados biológicos en los que una célula que no se divide y/o no se amplía se mantiene metabólicamente, siendo este último el uso de sinónimos con el término "mantenimiento".

Densidad celular

Una ventaja adicional al usar *P. fluorescens* en la expresión de proteínas recombinantes de mamífero incluye la capacidad de *P. fluorescens* para ser cultivada con alta densidad celular en comparación con *E. coli* u otros sistemas de expresión bacteriana. Para este fin, los sistemas de expresión de *P. fluorescens* de acuerdo con la presente invención pueden proporcionar una densidad celular de aproximadamente 20 g/L o más. Los sistemas de expresión de *P. fluorescens* de acuerdo con la presente invención también pueden proporcionar una densidad celular de al menos aproximadamente 70 g/L, tal como se establece en términos de biomasa por volumen, midiéndose la biomasa como peso de células secas.

25 En una realización, la densidad celular será de al menos 20 g/L. En otra realización, la densidad celular será de al menos 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 130 g/L, 140 g/L, o al menos 150 g/L.

En otras realizaciones, la densidad celular en la inducción estará entre 20 g/L y 150 g/L; 20 g/L y 120 g/L; 20 g/L y 80 g/L; 25 g/L y 80 g/L; 30 g/L y 80 g/L; 35 g/L y 80 g/L; 40 g/L y 80 g/L; 45 g/L y 80 g/L; 50 g/L y 80 g/L; 50 g/L y 75 g/L; 50 g/L y 70 g/L; 40 g/L y 80 g/L.

Aislamiento y purificación

Las proteínas de esta invención se pueden aislar purificadas hasta una pureza sustancial mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica, que incluyen, entre otras, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de níquel, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de fase inversa, cromatografía de lectina, electroforesis preparativa, solubilización con detergente, precipitación selectiva con sustancias tales como cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación, y otros. Por ejemplo, las proteínas que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas pueden fusionarse reversiblemente con un ligando. Con el ligando apropiado, la proteína puede adsorberse selectivamente en una columna de purificación y luego liberarse de la columna en una forma relativamente pura. La proteína fusionada se remueve luego por actividad enzimática. Además, puede purificarse la proteína utilizando columnas de inmunoafinidad o columnas de Ni-NTA. Las técnicas generales se divulgan adicionalmente, por ejemplo, en R. Scopes (1982) Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag: N.Y.; Deutscher (1990) Guide to Protein Purification, Academic Press; la patente de Estados Unidos No. 4,511,503; S. Roe (2001) Protein Purification Techniques: A Practical Approach, Oxford Press; D. Bollag, et al. (1996) Protein Methods, Wiley-Lisa, Inc.; AK Patra et al. (2000) Protein Expr Purif, 18(2): 182-92; y R. Mukhija, et al. (1995) Gene 165(2): 303-6. Véase

- también, por ejemplo, Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification," Methods in Enzymology vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; Coligan, et al. (1996 y los suplementos periódicos) Current Protocols in Protein Science, Wiley/Greene, NY; y la literatura del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteína, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, Calif. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos apropiados, por ejemplo, a una secuencia FLAG o un equivalente que puede fusionarse a través de una secuencia extraíble con proteasa. Véase también, por ejemplo: Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12: 69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12: 87-98, Plenum Press, NY; y Crowe, et al. (1992) *QIAexpress*: el sistema de purificación de proteínas y expresión de alto nivel QUIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif.
- La detección de la proteína expresada se logra por métodos conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, técnicas de transferencia Western o inmunoprecipitación.
- La enzima producida y expresada en forma recombinante puede recuperarse y purificarse a partir de los cultivos celulares recombinantes mediante numerosos procedimientos, por ejemplo, puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación final, según sea necesario.
- Ciertas proteínas expresadas en esta invención pueden formar agregados insolubles ("cuerpos de inclusión"). Varios protocolos son adecuados para la purificación de proteínas de cuerpos de inclusión. Por ejemplo, la purificación de cuerpos de inclusión implica típicamente la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión mediante la ruptura de las células huésped, por ejemplo, mediante incubación en un regulador de TRIS/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 0,1 mM y PMSF 1 mM. La suspensión celular generalmente se lisa usando 2-3 pasadas a través de una prensa francesa. La suspensión celular también puede homogeneizarse usando un Polytron (Brinkman Instruments) o sonicarse en hielo. Los métodos alternativos de lisis de bacterias son evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J., EF Fritsch y T. Maniatis, eds. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ausubel et al., Eds. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*).
- Si es necesario, los cuerpos de inclusión pueden solubilizarse, y la suspensión de células lisadas puede centrifugarse típicamente para eliminar la materia insoluble no deseada. Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión se pueden renaturalizar por dilución o diálisis con un regulador compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, urea (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente 80%, en volumen/volumen) y clorhidrato de guanidina (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M). Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y puede producirse renaturalización tras la eliminación (por diálisis, por ejemplo) o la dilución del desnaturalizante, permitiendo la reformación de proteína inmunológicamente y/o biológicamente activa. Los expertos en la técnica conocen otros reguladores adecuados.
- Alternativamente, es posible purificar las proteínas recombinantes del periplasma del huésped. Después de la lisis de la célula huésped, cuando la proteína recombinante se exporta al periplasma de la célula huésped, la fracción periplásmica de la bacteria se puede aislar mediante choque osmótico frío además de otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, por ejemplo, las células bacterianas se pueden centrifugar para formar un sedimento. El sedimento puede resuspenderse en un regulador que contiene un 20% de sacarosa. Para lisar las células, las bacterias pueden centrifugarse y el sedimento puede resuspenderse en MgSO₄ 5 mM enfriado con hielo y mantenerse en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se puede centrifugar y el sobrenadante se puede decantar y guardar. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas del huésped mediante técnicas de separación estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.
- Un fraccionamiento inicial con sal puede separar muchas de las proteínas de células huésped no deseadas (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés. Un ejemplo de esto puede ser el sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita las proteínas al reducir efectivamente la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Las proteínas luego se precipitan con base en su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones más bajas de sulfato de amonio. Un protocolo típico incluye la adición de sulfato de amonio saturado a una solución de proteína de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante esté entre 20-30%. Esta concentración precipitará las proteínas más hidrófobas. El precipitado se descarta luego (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se agrega sulfato de amonio al sobrenadante a una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. El precipitado se solubiliza luego en regulador y el exceso de sal se elimina si es necesario, ya sea por diálisis o por diafiltración. Otros métodos que dependen de la solubilidad de las proteínas, tales como la precipitación en etanol frío, son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden usarse para fraccionar mezclas de proteínas complejas.
- El peso molecular de una proteína recombinante puede usarse para aislarla de proteínas de mayor y menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas de Amicon o Millipore). Como primer paso, la mezcla de proteínas puede ultrafiltrarse a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un límite de peso molecular más bajo que el peso molecular de la proteína de interés. El retenido de la ultrafiltración puede ultrafiltrarse luego contra una membrana con un corte molecular mayor que el peso

molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al filtrado. El filtrado puede someterse a cromatografía como se divulga a continuación.

- 5 Las proteínas recombinantes también pueden separarse de otras proteínas en función de su tamaño, carga superficial neta, hidrofobicidad y afinidad por los ligandos. Además, los anticuerpos producidos contra proteínas pueden conjugarse con matrices de columna y las proteínas inmunopurificarse. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica. Será evidente para un experto en la técnica que las técnicas cromatográficas se pueden realizar a cualquier escala y usando equipos de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

Renaturalización y replegamiento

- 10 La proteína insoluble se puede renaturalizar o replegar para generar una conformación de estructura proteica secundaria y terciaria. Pueden usarse etapas de replegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración del producto recombinante. El replegamiento y la renaturalización se pueden lograr usando un agente que se conoce en la técnica para promover la disociación/asociación de proteínas. Por ejemplo, la proteína puede incubarse con ditiotreitol seguido de incubación con sal disódica de glutatión oxidado seguido de incubación con un regulador que contiene un agente de replegamiento tal como urea.
- 15 La proteína recombinante también puede renaturalizarse, por ejemplo, dializándola contra una solución salina regulada con fosfato (PBS) o acetato de Na 50 mM, regulador de pH 6 más NaCl 200 mM. Alternativamente, la proteína puede replegarse mientras se inmoviliza en una columna, tal como la columna de Ni-NTA usando un gradiente lineal de urea 6M-1M en NaCl 500 mM, glicerol al 20%, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasa. La renaturalización puede realizarse en un período de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización,
- 20 las proteínas pueden eluirse mediante la adición de imidazol 250 mM. El imidazol se puede eliminar mediante una etapa final de diálisis frente a PBS o regulador de acetato de sodio 50 mM a pH 6 más NaCl 200 mM. La proteína purificada puede almacenarse a 4°C o congelarse a -80°C.

- Otros métodos incluyen, por ejemplo, los que se pueden describir en: MH Lee et al. (2002) *Protein Expr. Purif.* 25 (1): 166-73; W.K. Cho et al. (2000) *J. Biotechnology* 77 (2-3): 169-78; Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification", *Methods in Enzymology* vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; Coligan, et al. (1996 y Suplementos periódicos) *Current Protocols in Protein Science*, Wiley/Greene, NY; S. Roe (2001) *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, Oxford Press; D. Bollag, et al. (1996) *Protein Methods*, Wiley-Lisa, Inc.
- 25

Análisis de proteína o péptido activo

- 30 Típicamente, una proteína "activa" incluye proteínas que tienen una función biológica o un efecto biológico comparable a la proteína nativa correspondiente. En el contexto de proteínas esto típicamente significa que un polinucleótido o polipéptido comprende una función o efecto biológico que tiene al menos aproximadamente 20%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98% o 100% de función biológica en comparación con la proteína nativa correspondiente usando parámetros estándar. La
- 35 determinación de la actividad de la proteína se puede realizar utilizando ensayos biológicos comparativos específicos dirigidos correspondientes para proteínas particulares. Una indicación de una función o efecto biológico de proteína recombinante es que el polipéptido recombinante es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con el polipéptido nativo.

- 40 Las proteínas activas típicamente tienen una actividad específica de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la proteína nativa de mamífero. Además, la especificidad del sustrato (k_{cat}/K_m) es opcionalmente sustancialmente similar a la proteína nativa de mamífero. Típicamente, k_{cat}/K_m será al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la proteína nativa. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para analizar y cuantificar las medidas de actividad de proteínas y péptidos y la especificidad del sustrato (k_{cat}/K_m).

- 45 La actividad de una proteína recombinante de mamífero puede medirse mediante cualquier ensayo convencional o estándar *in vitro* o *in vivo* específico de proteína conocido en la técnica. La actividad de la proteína recombinante de mamífero producida por *Pseudomonas* puede compararse con la actividad de la proteína de mamífero nativa correspondiente para determinar si la proteína recombinante de mamífero exhibe actividad sustancialmente similar o equivalente a la actividad generalmente observada en la proteína nativa bajo las mismas condiciones fisiológicas o similares.

- 50 La actividad de la proteína recombinante se puede comparar con una actividad patrón de proteína nativa previamente establecida. Alternativamente, la actividad de la proteína recombinante puede determinarse en un ensayo comparativo simultáneo o sustancialmente simultáneo con la proteína nativa. Por ejemplo, se pueden usar ensayos *in vitro* para determinar cualquier interacción detectable entre una proteína recombinante y un objetivo, por ejemplo, entre una enzima expresada y un sustrato, entre la hormona expresada y el receptor hormonal, entre el
- 55 anticuerpo expresado y el antígeno, etc. Dicha detección puede incluir la medición de cambios colorimétricos, cambios de proliferación, muerte celular, repelencia celular, cambios en la radioactividad, cambios en la solubilidad, cambios en peso molecular medido por electroforesis en gel y/o métodos de exclusión en gel, capacidad de fosforilación, ensayos de especificidad de anticuerpos tales como ensayos ELISA, etc. Además, los ensayos *in vivo*

incluyen, pero no se limitan a, ensayos para detectar los efectos fisiológicos de la proteína producida por *Pseudomonas* en comparación con los efectos fisiológicos de la proteína nativa, por ejemplo, aumento de peso, cambio en el equilibrio electrolítico, cambio en el tiempo de coagulación de la sangre, cambios en la disolución del coágulo y la inducción de la respuesta antigénica. Generalmente, cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* puede usarse para determinar la naturaleza activa de la proteína recombinante de mamífero producida por *Pseudomonas* que permite un análisis comparativo de la proteína nativa siempre que tal actividad pueda ser ensayada. Alternativamente, las proteínas producidas en la presente invención se pueden ensayar para determinar la capacidad de estimular o inhibir la interacción entre la proteína y una molécula que normalmente interactúa con la proteína, por ejemplo, un sustrato o un componente de la ruta de la señal que la proteína nativa normalmente interactúa. Dichos ensayos pueden incluir típicamente las etapas de combinar la proteína con una molécula de sustrato en condiciones que permiten que la proteína interactúe con la molécula objetivo, y detectar la consecuencia bioquímica de la interacción con la proteína y la molécula objetivo.

Los ensayos que pueden utilizarse para determinar la actividad de la proteína se divulgan, por ejemplo, en: Ralph, P. J., et al. (1984) J. Immunol. 132: 1858; Saiki et al. (1981) J. Immunol. 127: 1044; Steward, W. E. II (1980) The Interferon Systems. Springer-Verlag, Vienna and New York; Broxmeyer, H. E., et al. (1982) Blood 60: 595; Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis eds. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Berger, S. L. y A. R. Kimmel eds. (1987) "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press; AK Patra et al. (2000) Protein Expr Purif 18(2): 182-92; Kodama et al. (1986) J. Biochem. 99: 1465-1472; Stewart et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 5209-5213; Lombillo et al. (1995) J. Cell Biol. 128: 107-115; Vale et al. (1985) Cell 42: 39-50.

Ejemplos

Cepas bacterias y condiciones de crecimiento

A menos que se especifique lo contrario, todas las cepas usadas para todas las pruebas de expresión de *Pseudomonas* se basaron en *P. fluorescens* cepa MB101. Se usaron las cepas JM109 (Promega), XL2 Blue (Stratagene) o Top 10 (Invitrogen) de *E. coli* para la clonación general. Para los estudios de expresión en *E. coli*, se usó BL21 (DE3) Gold. Las cepas de *P. fluorescens* se cultivaron en medio LB o en sales mínimas complementados con 15 µg/mL de tetraciclina y 30 µg/mL de kanamicina según fuera necesario a 30°C. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en LB suplementado con 30 µg/mL de kanamicina y/o 15 µg/mL de cloranfenicol, o 15 µg/mL de tetraciclina según fuera necesario a 37°C. Las células se indujeron con IPTG 0,3 mM después de la fase de crecimiento.

Detección de la actividad de la proteína (ensayo ELISA)

Las placas se recubrieron añadiendo 200 µL de la solución de β-galactosidasa a razón de 10 µg/mL en PBS (pH 7,6) a cada pozo de la placa de microtitulación. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 16 horas, luego se lavaron 3 veces con 200 µL de PBS + Tween-20 al 0,1% (PBS-T). El anticuerpo primario se diluyó en PBS con leche en polvo sin grasa al 2% (p/v). Se añadieron 200 µL del anticuerpo diluido a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron luego 4 veces con 200 µL de PBS-T. El anticuerpo secundario también se diluyó en PBS con leche en polvo sin grasa al 2% (p/v) y se añadieron 200 µL a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5-2 horas. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T. Se usa un anticuerpo terciario para detectar los anticuerpos scFv: anticuerpo antirratón de oveja conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA cat. # A5324). A cada pozo deseado se añadieron 200 µL de solución de anticuerpo diluido (o PBS-T) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T. A cada pozo se añadieron 200 µL del sustrato de pNPP Sigma Fast recién preparado (catálogo Sigma #R-2770). Después de 30 minutos, se detuvo la reacción añadiendo 50 µL de NaOH 3 M a cada pozo y se leyó la absorbancia a 405 nm.

Fermentación

El inóculo para el cultivo del fermentador para *P. fluorescens* es generado mediante la inoculación de un matraz de agitación que contiene 600 mL de un medio químicamente definido suplementado con extracto de levadura y dextrosa. La tetraciclina se agrega típicamente para asegurar el mantenimiento del plásmido recombinante en el cultivo iniciador durante su incubación durante la noche, así como también en el fermentador. El cultivo del matraz de agitación se transfiere asépticamente a un fermentador de 20 L que contiene un medio definido químicamente diseñado para soportar una alta biomasa, sin suplementación con extracto de levadura. El oxígeno se mantiene a un nivel positivo en el cultivo líquido mediante la regulación del flujo de aire en el fermentador y la velocidad de mezcla del agitador; el pH se mantiene a más de 6,0 mediante la adición de amoníaco acuoso. El proceso de fermentación de alta densidad en lotes alimentados se divide en una fase de crecimiento inicial de aproximadamente 24 horas y una fase de expresión génica (inducción) en la que se agrega un inductor para iniciar la expresión génica recombinante. La glucosa, en forma de jarabe de maíz, se alimenta durante todo el proceso de fermentación en concentraciones limitadas. La densidad de células objetivo para iniciar la fase de inducción es típicamente de 150 unidades OD a 575 nm. La fase de inducción de la fermentación normalmente se deja durante aproximadamente 45

a 55 horas. Durante esta fase, las muestras se retiran del fermentador para diversos análisis para determinar el nivel de expresión del gen objetivo, la densidad celular, etc.

Para cada experimento de fermentación para *E. coli*, una reserva de glicerol congelado se retira del almacenamiento a -80°C, se descongela y se diluye antes de inocular un matraz de agitación que contiene 600 mL de caldo LB suplementado con kanamicina. El cultivo del matraz de agitación se incuba a 37°C con agitación a 300 rpm durante la noche y luego se transfiere asépticamente a un fermentador de 20 L que contiene medio complejo. La temperatura en el fermentador se mantiene a 37°C, pH 7 mediante la adición de amoníaco acuoso y ácido fosfórico, y oxígeno disuelto a más del 20%. Después de una breve fase inicial del lote, el glicerol se alimenta en cantidades cada vez mayores para mantener el exceso de carbono. Cuando la densidad celular alcanza 24-28 unidades de OD a 600 nm, la expresión recombinante se efectúa mediante la adición de un inductor, tal como isopropil-tiogalactósido (IPTG). La fase de inducción de la fermentación típicamente continúa durante aproximadamente 3 a 5 horas a medida que el fermentador alcanza la capacidad volumétrica o cuando la velocidad de crecimiento comienza a disminuir significativamente. Durante esta fase, las muestras se retiran del fermentador para diversos análisis para determinar el nivel de expresión del gen objetivo, la densidad celular, etc.

Fraccionamiento de células y análisis SDS-PAGE

Las muestras se normalizan a A575 = 30, y se sedimenta 1 mL de cultivo normalizado. Las células se resuspenden en 1 mL de regulador de lisis (base Tris 50 mM, NaCl 200 mM, 5% de glicerol v/v, sal disódica de EDTA 20 mM, Triton X-100 al 0,5% v/v, DTT 1 mM). Se agrega un cóctel inhibidor de proteasa específico para lisados bacterianos (Sigma # P8465) a una concentración 1X. Las células resuspendidas se añaden a un tubo de microfuga de tapa de rosca de 2 mL, lleno aproximadamente 3/4 partes con perlas de vidrio de 0,1 mm, y las células se lisan mecánicamente usando 4 incubaciones de 1 minuto en un molino de bolas BioSpec en la configuración más alta. Las células se mantienen en hielo entre las incubaciones. Aproximadamente 100 µL de solución de células lisadas se retiran de las perlas, se transfieren a un nuevo tubo y se sedimentan. El sobrenadante (fracción soluble) se remueve a un nuevo tubo. El sedimento (fracción insoluble) se resuspende en un volumen igual (100 µL) de regulador de lisis más inhibidor de proteasa. Se añaden 5 µL de cada muestra a 5 µL de regulador de carga 2X LDS (Invitrogen) y se cargan en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4-12% o 10% (Invitrogen) y se procesan en regulador 1X MES o 1X MOPS como se indica.

Ejemplo 1: Expresión de scFV en el citoplasma

Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFV) encuentran un mayor uso como agentes de diagnóstico y terapéuticos. Estas proteínas relativamente pequeñas se obtienen fusionando genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas variables de una inmunoglobulina.

Clonación de Gall3 scFv

Se usó el gen Gall3 scFv (número de acceso del GenBank AF238290), clonado en el vector de presentación en fago pCANTAB6, (véase P Martineau et al. (1998) J. Mol. Biol. 280 (1): 117-27) como plantilla para amplificar un producto de 774 pares de bases, que posteriormente se clonó en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El gen scFv se escindió del vector TOPO con enzimas de restricción SpeI y Sall (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.) y se clonó en los sitios SpeI y XhoI del vector pMYC1803 de *P. fluorescens*, secuencia abajo del promotor Ptac, para producir pDOW1117. Los plásmidos resultantes se electroporaron en *P. fluorescens*. El gen Gall3 se clonó en el vector de expresión pET24d+ (Novagen, Madison, WI, EE.UU.), después de una amplificación tal que los sitios Sall y NcoI flanqueaban la secuencia codificante. Los productos de PCR se digirieron con Sall y NcoI y se clonaron en los mismos sitios del vector pET24d+ secuencia abajo del promotor T7. La construcción recién formada se usó luego para transformar células competentes XL2 Blue. Una vez que se confirmó la secuencia, la construcción de ADN se usó para transformar BL21 (DE3) Gold (Stratagene, San Diego, CA, EE.UU.) para la expresión.

Expresión de un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en *E. coli* y *P. fluorescens*

Las moléculas de scFv se expresaron tanto en *E. coli* como en *P. fluorescens*, entre ellos un scFv con actividad de unión al anticuerpo de cadena sencilla ga113 de proteína β-galactosidasa de *E. coli* (P. Martineau et al., "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm", J. Mol. Biol. 280 (1): 117-27 (1998)). *P. fluorescens* expresó aproximadamente seis veces más proteína que *E. coli* durante fermentación de 20 L, con 3,1 g/L de rendimiento en *P. fluorescens* y 0,5 g/L de rendimiento en *E. coli* como se determinó por SDS-PAGE y densitometría (véase la Tabla 8). *P. fluorescens* expresó aproximadamente el 96% de proteína soluble, mientras que *E. coli* expresa solo el 48% de proteína soluble.

Tabla 8: Resumen de fermentación de Gal13 (* en comparación con los estándares de BSA)

	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf/Ec</i>
Tiempo de fermentación (h)	8-9	70	8

	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf/Ec</i>
Título máximo de hGH (*g/L)	0,4 (85% cv)	3,1 (24% cv)	8
Biomasa seca (g/L)	ND (30)	59	(2)
hGH/biomasa (% p/p)	(1)	5	(5)

El material purificado de ambos sistemas de expresión se encontró que era activo en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como se muestra en la Figura 2. El material también se purificó a partir de la fracción soluble solo de volúmenes de lisado iguales a partir de lisados de ambas cepas usando cromatografía de afinidad. Finalmente, la recuperación volumétrica general para el proceso de *P. fluorescens* es aproximadamente 20 veces más eficiente que para *E. coli*, 1,34 g/L frente a 0,07 g/L.

Ejemplo 2: Expresión de γ -IFN humano en el citoplasma

Clonación de interferón gamma humano

Se amplificó el interferón gamma humano (hu- γ IFN, acceso del GenBank X13274) a partir de una biblioteca de ADNc de bazo humano (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU., catálogo # 10425-015) de manera que carecía de la señal de secreción nativa, con el terminal N del γ -IFN recombinante que comienza como Met-Cys-Tyr-Cys-Gln-Asp-Pro como se describe en PW Gray et al. (1982) Nature 298: 859-63. El producto resultante se clonó en el vector pCR2.1 TOPO y se confirmó la secuencia. El gen hu- γ IFN se escindió del vector TOPO con las enzimas de restricción SpeI y XhoI y se clonó en los mismos sitios de pMYC1803. En una reacción separada, el hu- γ IFN se amplificó de manera tal que los sitios AflIII y XhoI flanqueaban esa secuencia codificante. El fragmento resultante se clonó en el vector TOPO-TA (Invitrogen) y se transformó en células JM109 competentes de *E. coli* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El gen se aisló por digestión con AflIII y XhoI (New England Biolabs), se clonó en los sitios NcoI y XhoI de pET24d+ (Novagen, Madison, WI, EE.UU.) secuencia abajo del promotor T7, y se transformó en JM109. Un clon positivo se transformó en células BL21 de *E. coli* (DE3) (Novagen) para evaluar la expresión.

Purificación de interferón gamma humano

La pasta celular congelada de los cultivos de *P. fluorescens* se descongeló y se resuspendió en regulador de lisis (fosfato de potasio 50 mM, pH 7,2 que contenía NaCl 50 mM, EDTA 10 mM (ácido etilendiaminotetraacético, número de catálogo BP118-500, Fisher Scientific, Springfield, NJ, EE.UU.), PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, número de catálogo P-7626, Sigma, St. Louis, MO), ditiotreitól 1 mM (número de catálogo D-0632, Sigma), y benzamidina 1 mM (número de catálogo B-6506, Sigma)) en una proporción de aproximadamente 1 gramo de pasta de células por 2 mL de regulador de lisis. Las células se rompieron mediante tres pasadas a través de un microfluidizador (modelo 110Y, Microfluidics Corporation, Newton, MA, EE.UU.). Los restos celulares y las células intactas se eliminaron mediante centrifugación (durante 60 min a 23.708 x g y 4°C usando una centrífuga Beckman Coulter, modelo JA 25.50, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.). El sobrenadante resultante (extractos libres de células) se clarificó añadiendo tierra de diatomeas al 10% p/v (producto Celite, World Minerals, Inc., Goleta, CA, EE.UU.) y pasando el resultado a través de un filtro de papel (Whatman 1, número de catálogo 1001-150, Whatman Paper Ltd., Maidstone, Kent, Reino Unido) con filtración al vacío.

Se aplicaron extractos celulares clarificados a una columna de cromatografía de 3,2 cm x 13,5 cm de SP-Sepharose FAST FLOW (material de perlas de agarosa entrecruzado al 6%; número de catálogo 17-0709-10, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.) equilibrado en regulador A, a un caudal de 0,5 mL/min. La composición del Regulador A fue: HEPES 50 mM, pH 7,8 (es decir, N-(2-hidroxietil)piperazina)N'-(ácido 2-etanosulfónico), de Fisher Scientific, número de catálogo BP-310-100, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM y 0,02% de azida sódica (número de catálogo 71289, Sigma Chemical Co.). Después de la carga, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna (volumen de columna = 108 mL) de regulador A y 5 volúmenes de columna de regulador A que contenía NaCl 0,4 M. La columna se desarrolló adicionalmente aplicando un gradiente de 0,4 M a 1 M de NaCl en el mismo regulador a un caudal de 2 mL/min para un total de 7 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían IFN- γ puro se combinaron luego y se dializaron frente a 1X PBS (solución salina regulada con fosfato, pH 7,2) a 4°C. La proteína se concentró por ultrafiltración (usando una membrana de ultrafiltración YM30, catálogo No. 13722, de Millipore, Bedford, MA, EE.UU.), luego se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a 80°C.

Expresión del interferón γ humano en *E. coli* y *P. fluorescens*

El interferón γ humano se produce comercialmente mediante fermentación de *E. coli* que expresa el gen γ -IFN. La proteína se expresa citoplasmáticamente en una forma insoluble e inactiva. Para producir el polipéptido recombinante como un ingrediente farmacéutico activo, el interferón debe recuperarse, solubilizarse, replegarse y

luego purificarse. Todas estas operaciones unitarias aumentan en gran medida el costo de los bienes (COG) para esta proteína. Se usó una biblioteca de ADNc de bazo humano como plantilla para amplificar el ADNc de γ IFN sin la secuencia señal nativa y se clonó en vectores de expresión de *E. coli* y *P. fluorescens*. La construcción de *P. fluorescens* produjo ~ 4 g/L de proteína γ IFN durante una reacción de fermentación típica de 20 L. SDS-PAGE y un análisis Western de fracciones solubles e insolubles muestran que la mayoría de la proteína (95%) está presente en la fracción soluble. La Figura 1 muestra que hu- γ -IFN purificado a partir de la fracción soluble de muestras de *P. fluorescens* muestra actividad comparable a un estándar disponible comercialmente. La Figura 5 y la Tabla 9 muestran una comparación de la expresión de γ -IFN entre sistemas de expresión de *E. coli* y *P. fluorescens*.

Tabla 9: Resumen de fermentación de γ -IFN (* en comparación con los estándares de BSA)

	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf/Ec</i>
Tiempo de Fermentación (h)	7-9	55	6
Título máximo de hGH (*g/L)	3,9	4,5	1,5
Biomasa seca (g/L)	~22	100	4,5
hGH/biomasa (% p/p)	~17,7	4,5	0,25

Ensayo de actividad de interferón gamma humano

Líneas celulares y medios: Se obtuvieron células Hela (catálogo no. CCL-2) y virus de encefalomiocarditis (ECMV, catálogo no. VR-129B) de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HeLa se mantuvieron en medio esencial modificado de Eagle (Cellgro EMEM, Mediatech, Herdon, VA, EE.UU.) con suero bovino fetal al 10% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) a 37°C/5% de CO₂.

La actividad de hu- γ IFN purificada se ensayó usando un ensayo de inhibición viral como se describió previamente (JA Lewis (1987) en Lymphokines and Interferons: A Practical Approach MJ Clemens y colaboradores (eds.) (IRL Press Ltd, Oxford, Inglaterra). Brevemente, las células HeLa se sembraron en una placa de microtitulación de 96 pozos a razón de 3×10^4 por pozo. Después de 24 horas, se añadió hu- γ IFN purificado de *P. fluorescens*, o hu- γ IFN recombinante de *E. coli* (de R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), por triplicado a los pozos a razón de 0, 0,01 o 0,05 ng por pozo. Después de preincubar las células con hu- γ IFN durante 24 horas, se añadió ECMV en diluciones variables a conjuntos de pozos por triplicado. Se incubaron las células durante 5 días, después de lo cual se midió la viabilidad celular usando un ELISA de proliferación celular que monitoriza la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (catálogo no. 1647229, Roche Molecular Biochemicals, Inobjetivopolis, IN, EE.UU.). Los resultados se expresan como unidades de absorbancia, con una mayor absorbancia resultante de la presencia de un mayor número de células que se dividen activamente (vivas).

Ejemplo 3: Expresión de hGH en el citoplasma

Los cebadores se diseñaron para amplificar la hormona de crecimiento humana (hGH) a partir de bibliotecas de ADNc humano. Para este estudio, se amplificó hGH utilizando AmpliTaq polimerasa (Perkin Elmer) de acuerdo con el protocolo del fabricante, utilizando el plásmido anterior como plantilla y cebadores ELVlrev y hgh-sig, con un perfil de ciclo de PCR de 95°C durante 2 minutos (95°C durante 60 segundos, 42°C durante 120 segundos, 72°C durante 3 minutos) 25X. El producto resultante se purificó usando el kit de purificación de ADN por PCR Wizard (Promega), se digirió con enzimas de restricción SpeI y XhoI (New England Biolabs) y se clonó en los mismos sitios de pMYC1803 (véase la Figura 3). Se corrigió una mutación encontrada en la hGH amplificada usando el cebador hgh-sigcorr con ELVlrev y repitiendo los procedimientos de PCR y clonación.

Cebadores utilizados para clonar hGH.

hGH-sig	AGAGAACTAGTAAAAAGGAGAAATCCATGTTCCCAACCATTCCTT ATC
HGH-sigcorr	AGAGAACTAGTAAAAAGGAGAAATCCATGTTCCCAACCATTCCTT ATCCAGGCCTTTTGAC
ELVlfor	AGAGAACTAGTAAAAAGGAGAAATCCATGGCTACAGGCTCCCGGA CGTCC
ELVlrev	AGAGACTCGAGTCATTAGAAGCCACAGCTGCCCTCCAC

Purificación de hGH

Después de la fermentación de 20 L, se purificó la hGH a partir de la fracción insoluble de células de *E. coli* y *P. fluorescens*, excepto porque durante la elución de DEAE FF se usó un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M en lugar de una etapa de NaCl 0,25M.

Expresión de la hormona del crecimiento humana en *E. coli* frente a *P. fluorescens*.

El ADNc que codifica la hormona del crecimiento humana se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc de pituitaria humana. La secuencia nativa de señal de secreción se eliminó, y se manipuló una metionina del terminal N en las construcciones para la expresión microbiana. Para la expresión de *E. coli*, se transformó el vector pET25 que contenía el gen de hGH en BL21 (DE3), que contiene un gen de polimerasa T7 integrado necesario para la transcripción de hGH. Se llevaron a cabo estudios de expresión de *P. fluorescens* en la cepa MB214, que contiene un gen lacI integrado para controlar la expresión del promotor Ptac. Ambos sistemas de expresión se evaluaron a escala de fermentación de 20 L. Como se muestra en la Tabla 10, *P. fluorescens* (Pf) superó a *E. coli* (EC) en la cantidad de proteína producida por gramo de biomasa seca (1,6X como mucho).

Tabla 10: Resumen de la fermentación de hGH (* comparado con los estándares de BSA)

	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf/Ec</i>
Tiempo de Fermentación (h)	7-9	55	6
Título máximo de hGH (*g/L)	2,6 (23% de cv)	7,3 (5% de cv)	3
Biomasa seca (g/L)	37	66	2
hGH/biomasa (% p/p)	7	11	1,6

El fraccionamiento celular y el análisis SDS-PAGE muestran que la hGH se encuentra en la fracción insoluble en ambos sistemas de expresión (Figura 4). Sorprendentemente, se purificó aproximadamente 7 veces más monómero de hGH a partir de *P. fluorescens*, comparado con *E. coli*, a pesar de una diferencia de solo 1,6X en la producción de proteína por gramo de biomasa seca.

Tabla 11: Comparación de la purificación de hGH a partir de *E. coli* y *P. fluorescens*

Porción de 1.62-1.75 L de <i>P. fluorescens</i> que contiene rh-GH			
	Biomasa húmeda (g húmedo)	Monómero purificado (mg)	Dímero purificado (mg)
Soluble	mínima	NA	NA
Extracto lipídico	No detectado	--	--
Lípido insoluble	62,2-63,1	1.483	346
Porción de 1.5-1.6 L de <i>E. coli</i> que contiene rh-GH			
Soluble	mínimo	NA	NA
Extracto lipídico	No detectado	--	--

Porción de 1.5-1.6 L de <i>E. coli</i> que contiene rh-GH			
Lípido insoluble	35,0	200	333

Ejemplo 4: Expresión de proteínas en el periplasma

Caracterización de péptidos señal de secreción

5 Se descubrieron péptidos señal de secreción de *Pseudomonas fluorescens* mediante la formación y expresión de fusiones de ADN genómico de secuencia de codificación de fosfatasa alcalina (phoA) y se describen con más detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/996.007, presentada el 22 de noviembre de 2004. Seis de las fusiones expresadas se caracterizaron adicionalmente de la siguiente manera.

10 El sitio de escisión para las secuencias señal para los genes secretados identificados como fusiones phoA se dedujo por comparación con proteínas homólogas de otras *Pseudomonas*, mediante el programa SPScan (Menne et al., 2000). El sitio de segmentación de la lipoproteína putativa se dedujo por comparación con los motivos señal de peptidasa II; la señal de peptidasa II escinde específicamente las secuencias señal de las lipoproteínas. Los seis péptidos señal fueron analizados utilizando SignalP (un programa de software para el análisis de péptidos señal putativos; disponible en el Centro para Análisis de Secuencia Biológica de la Universidad Técnica de Dinamarca, en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Véase también, Nielson et al. (1997) *Protein Engineering* 10: 1-6. En
15 algunos casos, se usó una fuente suplementaria para caracterizar adicionalmente la identidad del péptido señal. Esta información está presente en la Tabla 12.

Tabla 12. Identidades de péptidos de señal de secreción

Identidad	Secuencia putativa de aminoácidos
Precursor EI de purina putativa, OprE	Lys Lys Ser Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Gly Ala Ile Ala Gln Gln Ala Gly Ala
Proteína putativa que se une a fosfato	Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly
Azurina putativa	Phe Ala Lys Leu Val Ala Val Ser Leu Leu Thr Leu Ala Ser Gly Gln Leu Leu Ala
Precursor de lipoproteína B periplasmática putativa	Ile Lys Arg Asn Leu Leu Val Met Gly Leu Ala Val Leu Leu Ser
Proteína putativa que se une a Lys-Arg-Orn	Gln Asn Tyr Lys Lys Phe Leu Leu Ala Ala Val Ser Met Ala Phe Ser Ala Thr Ala Met Ala
Proteína putativa que se une a Fe(III)	Met Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Thr Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr Leu Thr Leu Leu Ser Leu Thr Leu Leu Ser Pro Ala Ala His Ser

Análisis Western de las proteínas de fusión phoA para detectar proteínas de fusión

20 Para analizar si se produjeron las proteínas de fusión, se llevó a cabo un análisis Western con anticuerpo para fosfatasa alcalina en cultivos separados por centrifugación en una fracción de células completas (citoplasma y periplasma) y una fracción de caldo libre de células. De las cinco cepas para las que se determinó el sitio de inserción, cuatro (azurina putativa, proteína putativa de unión a fosfato, lipoproteína B periplasmática putativa, proteína putativa que se une a Fe (III)) produjeron una proteína de fusión del tamaño esperado, y una (proteína OprE
25 putativa) produjo una proteína de aproximadamente 40 kD más pequeña que la prevista, y una (proteína putativa que se une a Lys-Arg-Orn) produjo una proteína aproximadamente 20 kD más pequeña que la prevista.

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 40 V durante una hora usando el módulo de transferencia Xcell SureLock^{MR} Mini-Cell y XCell II^{MR} (Invitrogen). Los experimentos de transferencia Western se realizaron usando las instrucciones proporcionadas por el kit SuperSignal West
30 HisProbe^{MR} (Pierce).

Construcción, expresión y caracterización de una fusión pbp-hGH

El líder de secreción de proteína que se une a *P. fluorescens* se fusionó al terminal N del dominio maduro del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) y se ensayó su expresión y secreción.

La región de codificación de la secuencia señal pbp se amplificó por PCR a partir de un clon de la secuencia señal pbp de *P. fluorescens* como molde, usando sig_pbp para los cebadores (gctctagaggaggaacttatgaaactgaaacg) y pbp_hgh (gggaatggttggaaggccaccgctgtgc), luego se purificó en gel. Esto dio como resultado la producción de un fragmento de oligonucleótido que contiene el péptido señal pbp CDS y la secuencia de codificación para el extremo 5' del dominio maduro de hGH.

Se amplificó por PCR un ADNc que codifica la hormona de crecimiento humana a partir de una biblioteca de ADNc de pituitaria humana (Clontech, Palo Alto, CA) utilizando los cebadores ELVlfor (agagaactagtaaagagagaaatccatggctacagg

ctcccgagctcc) y ELVlrev (agagactcgagtcattagaagccacagctgcctccac), que se diseñaron para amplificar solo el dominio maduro de hGH y se clonaron en pMYC1 803/SpeI XhoI, formando pDOW2400. El gen hGH maduro se amplificó a partir de pDOW2400, utilizando los cebadores pbp_hgh_revcomp (gccaacgcggtggcctccaaccattccc) y hgh_rev (agagactcgagtcattagaagc cacagctgcctccacagagcgccac), luego se purificaron con columnas Strataprep (Stratagene) para eliminar los cebadores y otros componentes de la reacción. Para obtener el polinucleótido que codifica la fusión pbp-hGH, las dos reacciones de PCR se combinaron y se amplificaron de nuevo con sig_pbp for y hgh_rev para unir las dos piezas. El fragmento esperado de 681 pb se purificó con Strataprep como se indicó anteriormente, se digirió la restricción con XbaI y XhoI y se ligó a pDOW1269/XhoI SpeI desfosforilado para formar pDOW 1323-10, colocando pbp-hGH bajo el control del promotor tac en un vector análogo a pMYC1803, pero con un marcador seleccionable por pyrF en lugar de un gen marcador de resistencia a tetraciclina tetR. La mezcla de ligación se transformó en MB101 pyrF proC lacI^{Q1}. Los insertos fueron secuenciados por The Dow Chemical Company usando el método descrito anteriormente. La secuencia de ADN y de aminoácidos de esta fusión se presenta en (Figura 10) y (Figura 11), respectivamente.

Las cepas resultantes se analizaron primero en la escala del matraz de agitación. Las bandas inducidas del tamaño esperado para procesado y no procesado (22,2 kDa y 24,5 kDa, respectivamente) se detectaron mediante SDS-PAGE. Aproximadamente la mitad de la proteína se procesó (lo que indica la localización en el periplasma), y de la mitad procesada, aproximadamente la mitad estaba en la fracción soluble y la otra mitad en la fracción insoluble. Los estudios de expresión se ampliaron hasta biorreactores de 20 L. La densitometría de los geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie mostró que el 18% de la hGH total producida fue procesada y soluble. La cepa produjo 3,2 g/L de todas las formas de hGH; la procesada y soluble fue 0,6 g/L.

Construcción, expresión y caracterización de la fusión pbp-scFv

La secuencia señal putativa de 24 aminoácidos de proteína de unión a fosfato (es decir, que incluye MetI) se fusionó al marco de lectura abierto del gen gal2 scFv (gal2) en la posición del aminoácido +2 (Ala). Véase la Figura 8 y la Figura 9. La secuencia señal parece ser procesada, lo que indica secreción en el periplasma. Además, hay secreción en el caldo, en el que se detectó la proteína en el sobrenadante del cultivo libre de células. Sorprendentemente, la fusión con la secuencia señal de proteína de unión a fosfato parece mejorar la expresión de gal2 scFv en *P. fluorescens*. Sin la señal de secreción fusionada en el terminal amino, la expresión de gal2 scFv no era detectable.

Clonación de Gal2

La PCR se realizó usando cebadores sig_pbp para (arriba) y pbp_gal2SOE rev (ctgcacctgggcccaccgctgtt), que contiene un complemento inverso de pbp_gal2SOE para (aacgcggtggccgcccaggtgcag) y usando un plásmido que codifica el péptido señal de secreción pbp de *P. fluorescens* como plantilla. Esto dio como resultado la producción de un fragmento de oligonucleótido que contiene la secuencia de codificación del péptido señal pbp (CDS) y un CDS para el extremo 5' del anticuerpo de cadena sencilla de gal2 (scAb o scFv).

Se realizó la PCR usando los cebadores pbp_gal2SOE para y scFv2rev (acgcgtcgacttattaatggtgatgtgatgtgcgcgcg cacgtttgatc), y usando un polinucleótido que codifica gal2 como plantilla. Esto dio como resultado la producción de un fragmento de polinucleótido que contiene un CDS que codifica el extremo 3' del péptido señal de pbp y el marco de lectura abierto (ORE) que codifica gal2.

Los productos de reacción se purificaron. Se usaron aproximadamente 15 ng de cada uno como ADN "plantilla" en una reacción de PCR adicional usando cebadores sig_pbp_for y scFv2rev. Esto dio como resultado la producción de un fragmento de ácido nucleico con el péptido señal CDS fusionado a la secuencia codificante de gal2.

El aminoácido -I predicho de la secuencia de señal (que es el último aminoácido antes del sitio de escisión propuesto) se fusionó con el aminoácido +2 del gal2 scFv (Ala). La fusión resultante se clonó en el vector de *P. fluorescens* pMYC1803 bajo el control del promotor Ptac para producir el plásmido y pDOW1123 (pbp:gal2). El plásmido se transformó en la cepa MB 101 de *P. fluorescens* que porta el plásmido pCN51-lacI (descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/994.138, presentada el 19 de noviembre de 2004).

Fusión de la secuencia señal de proteína putativa de unión al fosfato a gal2 scFv

La secuencia señal de proteína de unión a fosfato se fusionó a un gen de anticuerpo de cadena sencilla y se ensayó para su secreción al periplasma y/o al sobrenadante del cultivo.

Tabla 13: Resumen de fermentación de Gal2 secretada (* en comparación con los estándares de BSA)

	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf/Ec</i>
Tiempo de fermentación (h)	8-9	50-70	8
Título máximo de hGH (*g/L)	1,6 (0,8 procesado)	9,3 (25% de cv)	6(12)
Biomasa seca (g/L)	18	(70)	4
hGH/biomasa (% p/p)	8,9 (4,4 procesado)	13	1,5 (3)

5

Las cepas resultantes se analizaron primero a escala del matraz de agitación. Las bandas inducidas del tamaño esperado para gal2 no procesado y procesado (29 kDa y 27 kDa) se detectaron a través de SDS-PAGE en la fracción de proteína insoluble (datos no mostrados). Los estudios de expresión se ampliaron hasta una fermentación de 20 L. Nuevamente, el análisis SDS-PAGE mostró que la mayoría de la proteína inducida se encuentra en la fracción proteica insoluble.

10

El análisis de Western también indicó que algo de gal2 procesado está presente en la fracción de proteína soluble para pbp:gal2 (pDOW1123). El análisis de Western de fracciones periplásmicas preparadas a partir de cepas que portan pDOW 1123 (utilizando el kit de periplastos Epicentre) mostró la presencia de proteína gal2 soluble.

15

Se aisló gal2 scFv recombinante a partir del extracto celular de un experimento de matraz agitado usando el protocolo Ni-NTA de Qiagen, luego se replegó como se describe en P. Martineau et al., J Mol. Biol. 280: 117-127 (1998). Se encontró que este anticuerpo era activo contra β -galactosidasa en un ensayo ELISA.

Además se divulga:

1. Un proceso para aumentar la expresión de una proteína recombinante de mamífero que comprende:

20

a. transformar una célula huésped de *Pseudomonas fluorescens* con un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de mamífero; y

b. hacer crecer la célula bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína recombinante de mamíferos;

en donde la proteína se expresa a un nivel aumentado cuando se compara con un nivel de expresión de la proteína bajo condiciones sustancialmente comparables en un sistema de expresión de *E. coli*.

2. El proceso del párrafo 1, que comprende además aislar la proteína recombinante de mamíferos.

25

3. El proceso del párrafo 2, que comprende además purificar sustancialmente la proteína recombinante de mamíferos.

4. El proceso del párrafo 1, en donde la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula huésped en una forma soluble.

30

5. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula en una forma insoluble.

6. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula en una forma activa.

7. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína de mamífero recombinante es un péptido humano.

35

8. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante se produce como más de aproximadamente 5% de proteína celular total.

9. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante se produce como más de aproximadamente 10% de proteína celular total.

10. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante se produce a una concentración de al menos 10 g/l.
11. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante se produce a una concentración de al menos 20 g/l.
12. El proceso del párrafo 1, en el que la proteína recombinante se produce a una concentración de al menos 40 g/l.
- 5 13. Un proceso para producir una proteína recombinante de mamífero en una célula huésped de *Pseudomonas fluorescens* que comprende:
 - a. transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de mamífero;
 - b. hacer crecer la célula bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína recombinante de mamíferos; y
 - c. aislar la proteína recombinante de mamíferos.
- 10 14. El proceso del párrafo 13, que comprende además purificar sustancialmente la proteína recombinante de mamífero.
- 15 15. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula huésped en una forma soluble.
16. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula huésped en forma insoluble.
17. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero está presente en la célula huésped en una forma activa.
18. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero es un péptido humano.
19. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína de mamífero recombinante tiene una masa de entre al menos aproximadamente 1 kD y aproximadamente 500 kD.
- 20 20. El proceso del párrafo 19, en el que la proteína de mamífero recombinante tiene una masa mayor que aproximadamente 30 kD.
21. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero se produce como más de aproximadamente 5% de proteína celular total.
- 25 22. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína de mamífero recombinante se produce como más de aproximadamente el 10% de proteína celular total.
23. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína de mamífero recombinante se produce a una concentración de al menos 10 g/l.
24. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero se produce a una concentración de al menos 20 g/l.
- 30 25. El proceso del párrafo 13, en el que la proteína recombinante de mamífero se produce a una concentración de al menos 40 g/l.
26. Un proceso para producir una proteína humana recombinante en una célula huésped que comprende:
 - a. transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica un péptido humano recombinante; y
 - b. hacer crecer la célula bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína humana de mamífero recombinante;
- 35 en donde la célula huésped es *Pseudomonas fluorescens*.
27. El proceso del párrafo 26, en el que la proteína humana recombinante está presente en forma soluble en la célula huésped.
28. El proceso del párrafo 26, en el que la proteína humana recombinante está presente en una forma activa en la
- 40 célula huésped.
29. Una célula de *Pseudomonas fluorescens* que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido humano recombinante.
30. La célula del párrafo 29, en la que se expresa el péptido humano recombinante.

Listado de Secuencias

<110> Pfenex, Inc.
 <120> Expresión de proteínas de mamífero en *Pseudomonas fluorescens*
 <130> P114122EP
 <140> 05705852.1
 5 <141> 2005-01-18
 <150> US 60/537.148
 <151> 2004-01-16
 <150> US 60/564.798
 <151> 2004-04-22
 10 <160> 27
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 609
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 1

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160

ES 2 707 786 T3

Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu 165	Ile	Ala	Arg	Arg	His 170	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala 175	Pro
Glu	Leu	Leu	Phe 180	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr 185	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr 190	Glu	Cys
Cys	Gln	Ala 195	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala 200	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys 205	Leu	Asp	Glu
Leu	Arg 210	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala 215	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln 220	Arg	Leu	Lys	Cys
Ala 225	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe 230	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe 235	Lys	Ala	Trp	Ala	Val 240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln 245	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala 250	Glu	Phe	Ala	Glu	Val 255	Ser
Lys	Leu	Val	Thr 260	Asp	Leu	Thr	Lys	Val 265	His	Thr	Glu	Cys	Cys 270	His	Gly
Asp	Leu	Leu 275	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp 280	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala 285	Lys	Tyr	Ile
Cys	Glu 290	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile 295	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys 300	Glu	Cys	Cys	Glu
Lys 305	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys 310	Ser	His	Cys	Ile	Ala 315	Glu	Val	Glu	Asn	Asp 320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp 325	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala 330	Ala	Asp	Phe	Val	Glu 335	Ser
Lys	Asp	Val	Cys 340	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu 345	Ala	Lys	Asp	Val	Phe 350	Leu	Gly
Met	Phe	Leu 355	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg 360	Arg	His	Pro	Asp	Tyr 365	Ser	Val	Val
Leu	Leu 370	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys 375	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr 380	Leu	Glu	Lys	Cys
Cys 385	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro 390	His	Glu	Cys	Tyr	Ala 395	Lys	Val	Phe	Asp	Glu 400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val 405	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn 410	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn 415	Cys
Glu	Leu	Phe	Lys 420	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr 425	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala 430	Leu	Leu

ES 2 707 786 T3

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 2

<211> 698

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
20 25 30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr

ES 2 707 786 T3

50		55		60											
Leu 65	Asp	Cys	Ile	Arg	Ala 70	Ile	Ala	Ala	Asn	Glu 75	Ala	Asp	Ala	Val	Thr 80
Leu	Asp	Ala	Gly	Leu 85	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr 90	Leu	Ala	Pro	Asn	Asn 95	Leu
Lys	Pro	Val	Val 100	Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly 105	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro 110	Gln	Thr
Phe	Tyr	Tyr 115	Ala	Val	Ala	Val	Val 120	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly 125	Phe	Gln	Met
Asn	Gln 130	Leu	Arg	Gly	Lys	Lys 135	Ser	Cys	His	Thr	Gly 140	Leu	Gly	Arg	Ser
Ala 145	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro 150	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr 155	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu 160
Pro	Arg	Lys	Pro	Leu 165	Glu	Lys	Ala	Val	Ala 170	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly 175	Ser
Cys	Ala	Pro	Cys 180	Ala	Asp	Gly	Thr	Asp 185	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys 190	Gln	Leu
Cys	Pro	Gly 195	Cys	Gly	Cys	Ser	Thr 200	Leu	Asn	Gln	Tyr	Phe 205	Gly	Tyr	Ser
Gly	Ala 210	Phe	Lys	Cys	Leu	Lys 215	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp 220	Val	Ala	Phe	Val
Lys 225	His	Ser	Thr	Ile	Phe 230	Glu	Asn	Leu	Ala	Asn 235	Lys	Ala	Asp	Arg	Asp 240
Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu 245	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr 250	Arg	Lys	Pro	Val	Asp 255	Glu
Tyr	Lys	Asp	Cys 260	His	Leu	Ala	Gln	Val 265	Pro	Ser	His	Thr	Val 270	Val	Ala
Arg	Ser	Met 275	Gly	Gly	Lys	Glu	Asp 280	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu 285	Leu	Asn	Gln
Ala	Gln 290	Glu	His	Phe	Gly	Lys 295	Asp	Lys	Ser	Lys	Glu 300	Phe	Gln	Leu	Phe
Ser 305	Ser	Pro	His	Gly	Lys 310	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys 315	Asp	Ser	Ala	His	Gly 320
Phe	Leu	Lys	Val	Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Lys	Met	Tyr	Leu	Gly	Tyr

ES 2 707 786 T3

				325						330						335			
Glu	Tyr	Val	Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Gln	Glu				
			340					345					350						
Ala	Pro	Thr	Asp	Glu	Cys	Lys	Pro	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Leu	Ser	His				
		355					360					365							
His	Glu	Arg	Leu	Lys	Cys	Asp	Glu	Trp	Ser	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Lys				
	370					375					380								
Ile	Glu	Cys	Val	Ser	Ala	Glu	Thr	Thr	Glu	Asp	Cys	Ile	Ala	Lys	Ile				
385					390					395					400				
Met	Asn	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Phe	Val	Tyr				
				405					410					415					
Ile	Ala	Gly	Lys	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	Tyr	Asn				
			420					425					430						
Lys	Ser	Asp	Asn	Cys	Glu	Asp	Thr	Pro	Glu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ala	Val				
		435					440					445							
Ala	Val	Val	Lys	Lys	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Thr	Trp	Asp	Asn	Leu	Lys				
	450					455					460								
Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn				
465					470					475					480				
Ile	Pro	Met	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	His	Cys	Arg	Phe	Asp				
				485					490					495					
Glu	Phe	Phe	Ser	Glu	Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser				
			500					505					510						
Leu	Cys	Lys	Leu	Cys	Met	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Pro	Asn				
		515					520					525							
Asn	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Val				
	530					535					540								
Glu	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Asn				
545					550					555					560				
Thr	Gly	Gly	Lys	Asn	Pro	Asp	Pro	Trp	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Lys				
				565					570					575					
Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Glu	Glu				
			580					585					590						
Tyr	Ala	Asn	Cys	His	Leu	Ala	Arg	Ala	Pro	Asn	His	Ala	Val	Val	Thr				

ES 2 707 786 T3

595

600

605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
690 695

<210> 3

<211> 333

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac 60
ccagccgcag cctttgtgaa ccaacacctg tgcggctcac acctggtgga agctctctac 120
ctagtgtgcg gggaaacgagg cttcttctac acacccaaga cccgccggga ggcagaggac 180
ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg 240
gccctggagg ggtccctgca gaagcgtggc attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc 300
tcctcttacc agctggagaa ctactgcaac tag 333

<210> 4

10 <211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> hGH-sig

15 <400> 4

agagaactag taaaaggag aaatccatgt tccaacat tccctatc 49

<210> 5

<211> 60

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>
 <223> hGH-sigcorr
 <400> 5
 agagaactag taaaaggag aaatccatgt tccaacatc tccctatcc aggcctttg 60
 5 <210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> ELVlfor
 <400> 6
 agagaactag taaaaggag aaatccatgg ctacaggctc cgggacgtcc 50
 <210> 7
 <211> 38
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ELVlrev
 <400> 7
 20 agagactcga gtcattagaa gccacagctg cctccac 38
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas fluorescens*
 25 <400> 8
 Lys Lys Ser Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Gly Ala Ile Ala Gln
 1 5 10 15
 Gln Ala Gly Ala
 20
 <210> 9
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas fluorescens*
 <400> 9
 Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 <210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 10

Phe Ala Lys Leu Val Ala Val Ser Leu Leu Thr Leu Ala Ser Gly Gln
1 5 10 15

5 Leu Leu Ala

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 11

Ile Lys Arg Asn Leu Leu Val Met Gly Leu Ala Val Leu Leu Ser
1 5 10 15

<210> 12

<211> 22

15 <212> PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 12

Gln Asn Tyr Lys Lys Phe Leu Leu Ala Ala Ala Val Ser Met Ala Phe
1 5 10 15

Ser Ala Thr Ala Met Ala
20

<210> 13

20 <211> 31

<212> PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 13

Met Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Thr Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr
1 5 10 15

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

25 <210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> pbp_hgh_revcomp
 <400> 14
 gccaacgcgg tggcctccc aaccattccc 30
 <210> 15
 5 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> hgh_rev
 10 <400> 15
 agagactcga gtcattagaa gccacagctg ccctccacag agcggcac 48
 <210> 16
 <211> 192
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> hGH sin secuencia señal del constructo
 <400> 16

ES 2 707 786 T3

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

<210> 17

<211> 475

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

agagaactag taaaaaggag aaatccatgc agggccaatt ttttagagaa atagaaaact 60
taaaggagta ttttaatgca agtagcccag atgtagctaa ggtgggcct ctcttctcag 120
aaattttgaa gaattggaaa gatgaaagtg acaaaaaaat tattcagagc caaattgtct 180
ccttctactt caaactcttt gaaaacctca aagataacca ggtcattcaa aggagcatgg 240
atatcatcaa gcaagacatg tttcagaagt tcttgaatgg cagctctgag aaactggagg 300
acttcaaaaa gctgattcaa attccggtgg atgatctgca gatccagcgc aaagccataa 360
atgaactcat caaagtgatg aatgacctgt caccaaaatc taacctcaga aagcggaaga 420
gaagtcagaa tctctttcga ggccggagag catcaacgta atgactcgag tctct 475

<210> 18

<211> 834

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> fusión de anticuerpo de cadena sencilla gal2 de proteína de unión a fosfato

<400> 18

```

atgaaactga aacgtttgat ggcggcaatg acttttgtcg ctgctggcgt tgcgaccgcc      60
aacgcggtgg ccgcccaggt gcagctgcag gagtcggggc caggactggt gaagccttcg      120
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggtggttcca tcagtagtta tcactggagc      180
tggatccggc agcccccagg gaagggactg gagtggattg ggtatatcta ttacagtggg      240
agcaccaact acaaccctc cctcaagaat cgagtcacca tatctgtaga caggtccaag      300
aaccagttct ccctgaacct gaggtctgtg accgctgcag acacggccgt gtattactgt      360
gcgcgaggaa cgtatggccc agccggagat gcttttgata tctgggggca agggaccacg      420
gtcacctctc cgagtgggtg aggcggttca ggcggagggt gcagcggcgg tggcggatcg      480
gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctattggaga cagagtcacc      540
atcacctgcc gggccagtga gggatattat cactggttgg cctggtatca gcagaagcca      600
gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcctctagtt tagccagtgg ggcccatca      660
aggtccagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      720
gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tatagtaatt atccgctcac tttcggcgga      780
gggaccaagc tggagatcaa acgtgcggcc gcacatcacc atcatcacca ttaa      834

```

<210> 19

<211> 276

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fusión de anticuerpo de cadena sencilla gal2 de proteína de unión a fosfato

<400> 19

```

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

Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
          20          25          30

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
          35          40          45

```

15

Val Ser Gly Gly Ser Ser Ser Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro
50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser
65 70 75 80

Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
85 90 95

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Gly Pro Ala Gly
115 120 125

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
145 150 155 160

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp
165 170 175

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu
180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
195 200 205

Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
225 230 235 240

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
245 250 255

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His His
260 265 270

His His His His
275

<210> 20

<211> 648

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> fusión de la hormona de crecimiento humano a la proteína de unión a fosfato

<400> 20

ES 2 707 786 T3

```

atgaaactga aacgtttgat ggcggcaatg acttttgtcg ctgctggcgt tgcgaccgcc      60
aacgcggtgg ccttcccaac cattccctta tccaggcctt ttgacaacgc tatgctccgc      120
gcccatcgtc tgcaccagct ggcctttgac acctaccagg agtttgaaga agcctatatc      180
ccaaaggaac agaagtattc attcctgcag aacccccaga cctccctctg tttctcagag      240
tctattccga caccctccaa cagggaggaa acacaacaga aatccaacct agagctgctc      300
cgcatctccc tgctgctcat ccagtcgtgg ctggagcccg tgcagttcct caggagtgtc      360
ttcgccaaca gcctggtgta cggcgctctt gacagcaacg tctatgacct cctaaaggac      420
ctagaggaag gcatccaaac gctgatgggg aggctggaag atggcagccc cgggactggg      480
cagatcttca agcagaccta cagcaagttc gacacaaact cacacaacga tgacgcacta      540
ctcaagaact acgggctgct ctactgcttc aggaaggaca tggacaaggt cgagacattc      600
ctgcgcatcg tgcagtgccg ctctgtggag ggcagctgtg gcttctaa      648

```

<210> 21

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fusión de la hormona de crecimiento humano a la proteína de unión a fosfato

<400> 21

```

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

```

10

ES 2 707 786 T3

130

135

140

Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly
145 150 155 160

Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn
165 170 175

Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys
180 185 190

Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser
195 200 205

Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

<210> 22

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sig_pbp

<400> 22

10 gctctagagg aggtaactta tgaaactgaa acg 33

<210> 23

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> pbp_hgh

<400> 23

gggaatggtt gggaaggcca ccgcgttggc 30

<210> 24

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> pbp_gal2SOE rev

25 <400> 24

ctgcacctgg gcggccaccg cggt 24

<210> 25

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> pbp_gal2SOE para
 <400> 25
 aaccgcggtg gccgcccagg tgcag 25
 <210> 26
 <211> 31
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> scFv2rev
 <400> 26
 15 atgatggtga tgtgcggccg cacgtttgat c 31
 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223>
 <400> 27
 acgcgtcgac ttattaatgg tg 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína o péptido recombinante de mamífero en una célula huésped de Pseudomonad, comprendiendo el método:
 - a. transformar la célula huésped de Pseudomonad con un ácido nucleico que codifica una proteína o péptido recombinante de mamífero; y
 - b. hacer crecer la célula bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína o péptido recombinante de mamífero; y
 - c. aislar la proteína o péptido recombinante,en el que la proteína o péptido recombinante está presente en la célula huésped en forma soluble o insoluble, y
- 10 en el que la proteína o péptido recombinante de mamífero es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
2. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la proteína o el péptido se expresa a un nivel aumentado cuando se compara con un nivel de expresión de la proteína o el péptido bajo condiciones sustancialmente comparables en un sistema de expresión de *E. coli*.
3. El método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína o péptido recombinante de mamífero está presente en la célula en una forma activa.
- 15 4. El método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína recombinante es una proteína humanizada.
5. El método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido recombinante de mamífero es un péptido humano.
- 20 6. El método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína o el péptido se produce como más de aproximadamente un 5% de proteína celular total o en una concentración de al menos 10 g/l.
7. El método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula se cultiva en un medio de sales minerales.
- 25 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende al menos dos vectores de expresión, preferiblemente en el que dichos al menos dos vectores de expresión comprenden un primer par promotor-cistrón y un segundo par promotor-cistrón.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho primer par promotor-cistrón es una cadena ligera de inmunoglobulina y dicho segundo par promotor-cistrón es una cadena pesada de inmunoglobulina.
- 30 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la cadena ligera y la cadena pesada están situadas en el mismo plásmido.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho primer o segundo par promotor-cistrón comprende además una región de iniciación de la traducción enlazada operativamente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo, preferiblemente en donde la región de iniciación de la traducción proporciona diferentes fuerzas de traducción al primer y segundo par promotor-cistrón.
- 35 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ácido nucleico codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos dos unidades de traducción separadas y además en el que las unidades de traducción se expresan de manera secuencial, preferiblemente en el que dichos al menos dos unidades de traducción separadas comprenden una cadena ligera y una cadena pesada.
- 40 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo de cadena completa o un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂-cremallera de leucina, Fv, dsFv, y anticuerpo anti-CD18.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho fragmento Fab comprende un fragmento de cadena pesada y ligera.
- 45 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humano o anticuerpo humanizado.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho método comprende además enlazar una secuencia de señal de secreción a dicho anticuerpo.

17. Una célula de *Pseudomonads* que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano recombinante o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente en el que la célula es una célula de *Pseudomonas fluorescens*.

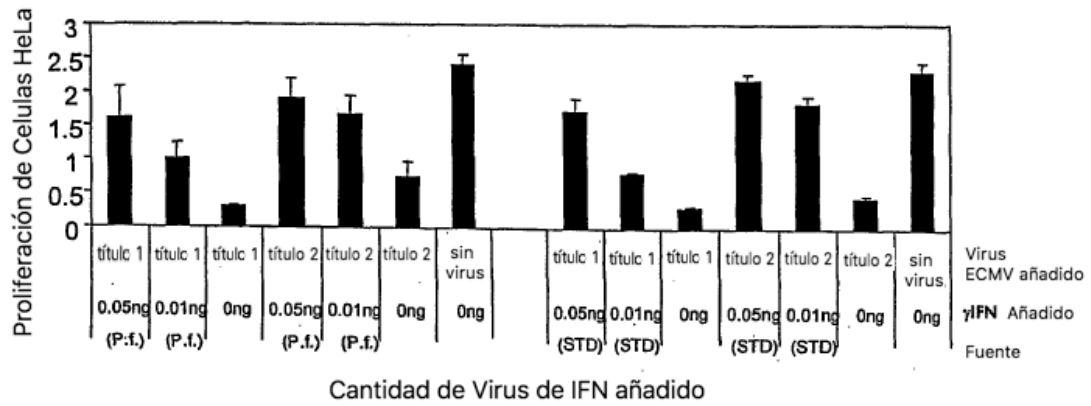


FIGURA 1

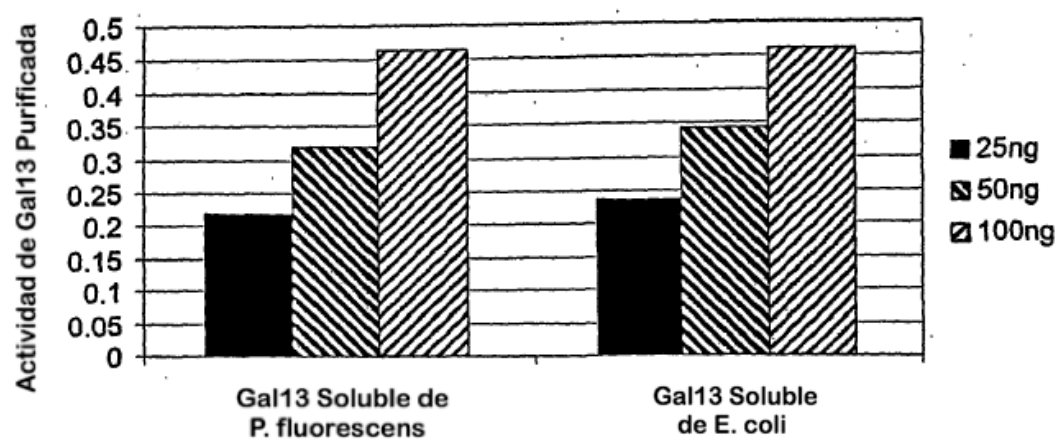
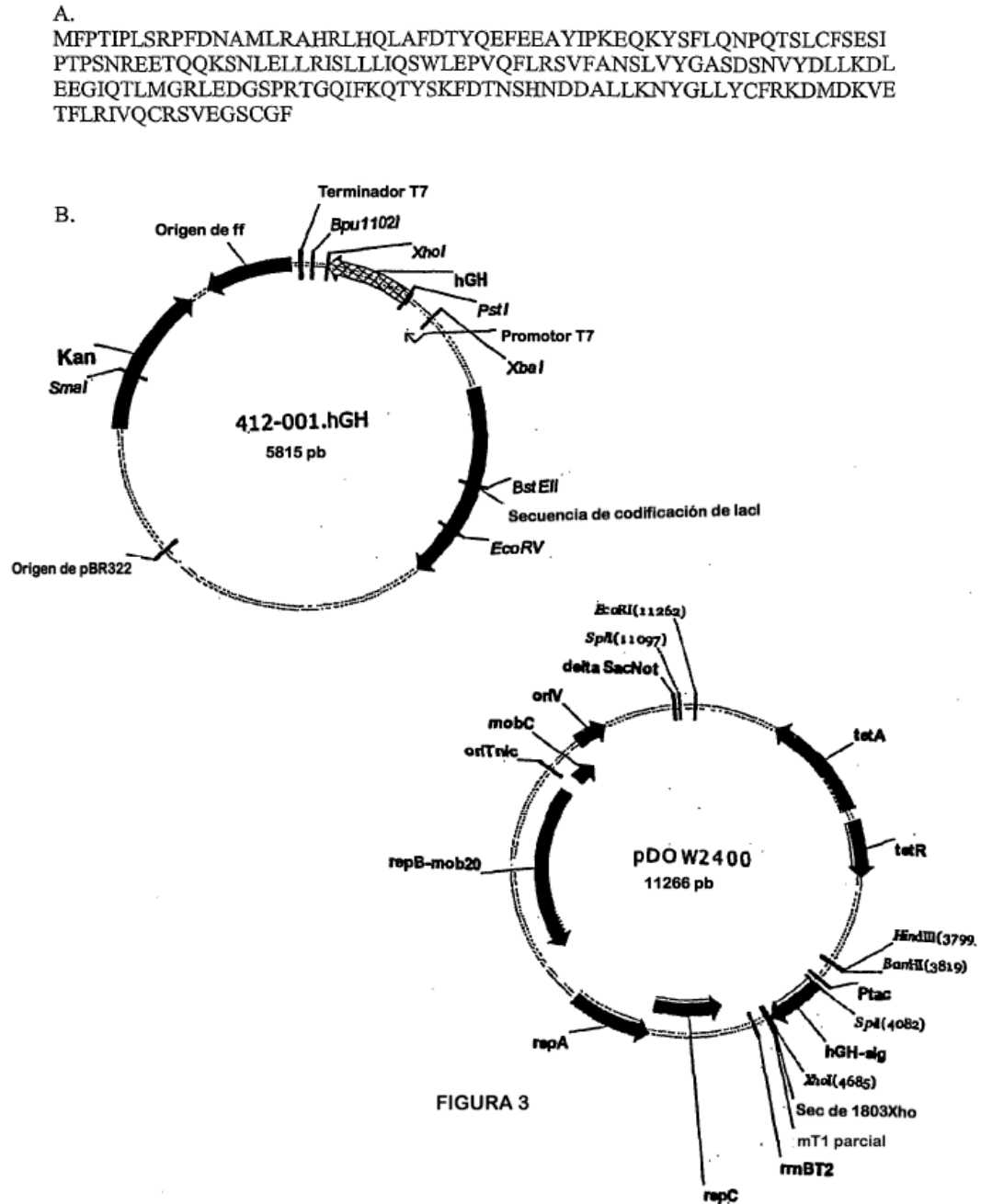


FIGURA 2



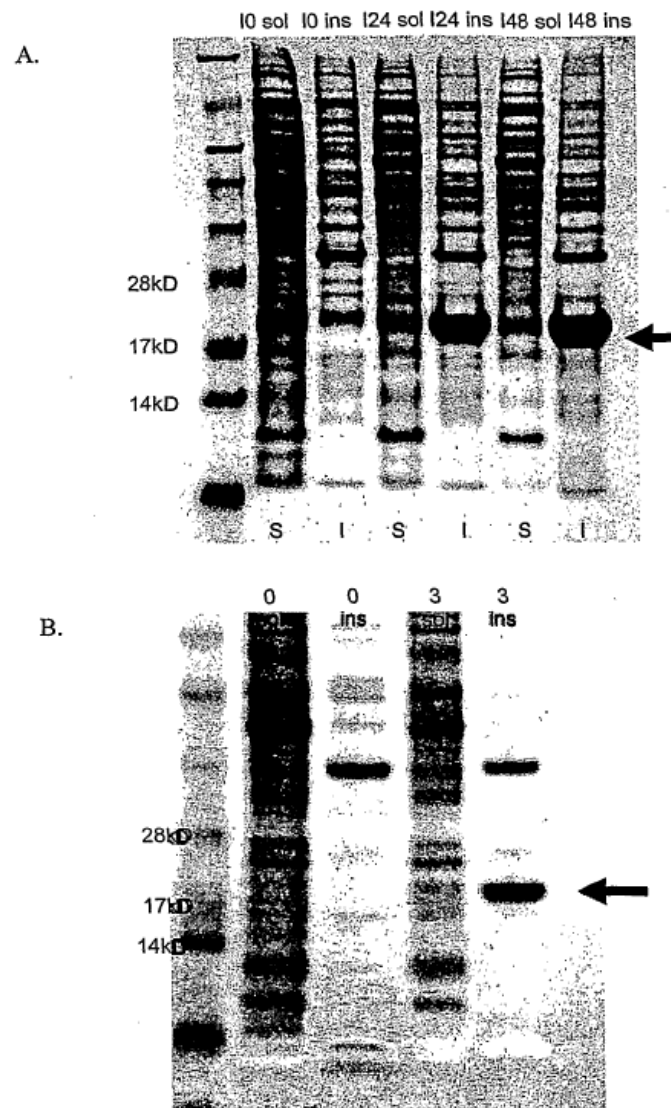


FIGURA 4

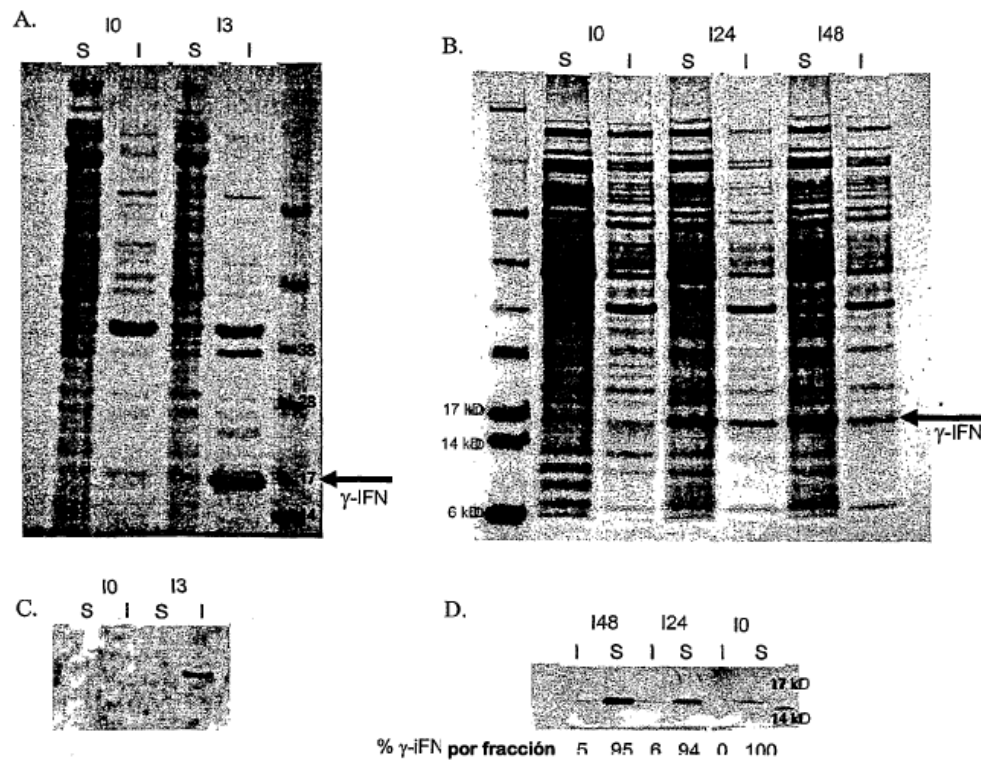


FIGURA 5

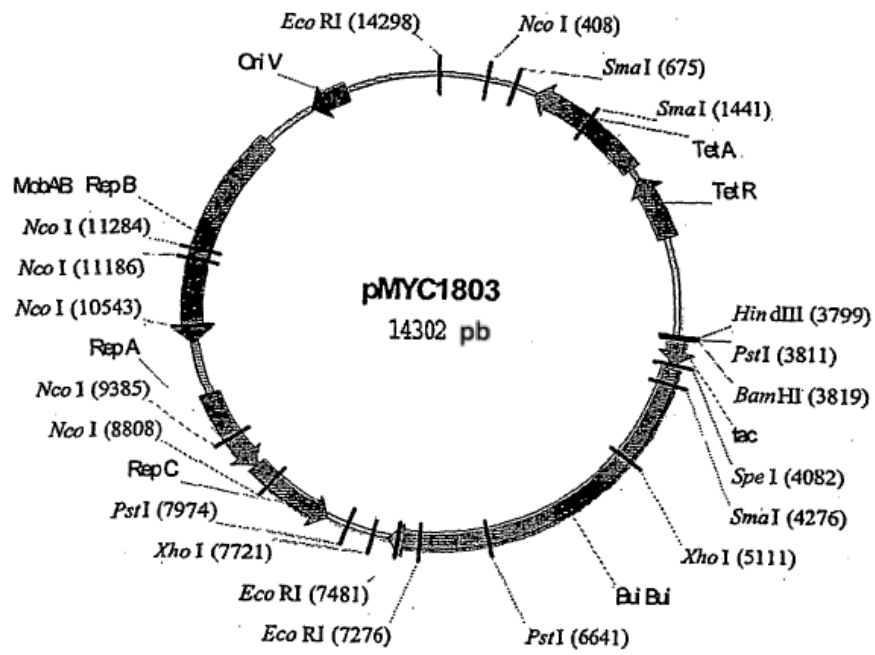


FIGURA 6

agagaactagtagtaaaaggagaaatccATGCAGGGCCAAATTTTTTAA
1 -----+-----+-----+-----+----- 47
tctottgatcatttttctctttaggTACGTCCCGGTTAAAAAATCT

M Q G Q F F R

GAATAGAAAACTTAAAGGAGTATTTTAATGCAAGTAGCCAGATGTAGCTAAGGGTGGG
48 -----+-----+-----+-----+-----+ 107
CTTTATCTTTTGAATTCCTCATAAAATTACGTTTCATCGGGTCTACATCGATTCCCACCC

E I E N L K E Y F N A S S P D V A K G G

CCTCTCTTCTCAGAAATTTGAAGAATTGGAAGAGTGAAAGTGACAAAAAATTATTAG
108 -----+-----+-----+-----+-----+ 167
GGAGAGAAGAGTCTTTAAACTTCTTAACCTTCTACTTTCACTGTTTTTTTAATAAGTC

P L F S E I L K N W K D E S D K K I I Q

AGCCAAATGTCTCCTTCTACTTCAAACCTTTGAAAACCTCAAAGATAACCAGGTCATT
168 -----+-----+-----+-----+-----+ 227
TCGGTTTAAACAGAGGAAGATGAAGTTTGAGAACTTTTGAGAGTTTCTATTGGTCCAGTAA

S Q I V S F Y F K L F E N L K D N Q V I

CAAAGGAGCATGGATATCATCAAGCAAGACATGTTTCAGAAGTTCTTGAATGGCAGCTCT
228 -----+-----+-----+-----+-----+ 287
GTTTCCTCGTACCTATAGTAGTTCGTTCTGTACAAAGTCTTCAAGAACTTACCGTCGAGA

Q R S M D I I K Q D M F Q K F L N G S S

GAGAACTGGAGGACTTCAAAAAGCTGATTCAAATTCGGTGGATGATCTGCAGATCCAG
288 -----+-----+-----+-----+-----+ 347
CTCTTTGACCTCCTGAAGTTTTTCGACTAAGTTTAAGGCCACCTACTAGACGTCTAGGTC

E K L E D F K K L I Q I P V D D L Q I Q

CGCAAAGCCATAAATGAAGTCAAGTGAATGACCTGTACCAAAAATCTAACCTC
348 -----+-----+-----+-----+-----+ 407
GCGTTTCGGTATTCTTCTGAGTAGTTTCACTACTTACTGGACAGTGGTTTTAGATTGGAG

R K A I N E L I K V M N D L S P K S N L

AGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGAATCTCTTCGAGGCCGGAGAGCATCAACGtaatgactcgagtctct
408 -----+-----+-----+-----+-----+ 475
TCTTCGCTTCTCTTCACTCTTAGAGAAAGCTCCGGCTCTCGTAGTTGCattactgagctcagaga

R K R K R S Q N L F R G R R A S T *

FIGURA 7

```

atg aaa ctg aaa cgt ttg atg gcg sca atg act ttt gtc gct gct ggc      48
Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly
1      5      10      15

gtt gcg acc gcc aac gcg gtg gcc gcc cag gtg cag ctg cag gag tcg      96
Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
20     25     30

ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act      144
Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
35     40     45

gtc tct ggt ggt tcc atc agt agt tat cac tgg agc tgg atc cgg cag      192
Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln
50     55     60

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg      240
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly
65     70     75     80

agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag aat cga gtc acc ata tct gta      288
Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val
85     90     95

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aac ctg agg tct gtg acc gct      336
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala
100    105    110

gca gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg cga gga acg tat ggc cca gcc      384
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Gly Pro Ala
115    120    125

gga gat gct ttt gat atc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcg      432
Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
130    135    140

agt ggt gga gcc ggt tca ggc gga ggt gcc agc gcc ggt gcc gga tcg      480
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145    150    155    160

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga      528
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
165    170    175

gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agt gag ggt att tat cac tgg      576
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
180    185    190

ttg gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc      624
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
195    200    205

tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc gcc      672
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
210    215    220

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct      720
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
225    230    235    240

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat cag ctc      768
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
245    250    255

act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gcg gcc gca cat      816
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His
260    265    270

cac cat cat cac cat taa      834
His His His His His
275

```

FIGURA 8

Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly
 Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 20 25 30
 Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
 35 40 45
 Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln
 50 55 60
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly
 65 70 75 80
 Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val
 85 90 95
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala
 100 105 110
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Gly Pro Ala
 115 120 125
 Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Asp Ilr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 165 170 175
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
 180 185 190
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu The Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 225 230 235 240
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His
 260 265 270
 His His His His His
 275

FIGURA 9

atg aaa ctg aaa cgt ttg atg gcg gca atg act ttt gtc gct gct ggc	48
Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly	
1 5 10 15	
ggt gcg acc gcc aac gcg gtg gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg	96
Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg	
20 25 30	
cct ttt gac aac gct atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc	144
Pro Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala	
35 40 45	
ttt gac acc tac cag gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag	192
Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln	
50 55 60	
aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag acc tcc ctc tgt ttc tca gag	240
Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu	
65 70 75 80	
tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag aaa tcc aac	288
Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn	
85 90 95	
cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag	336
Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu	
100 105 110	
ccc gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc	384
Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly	
115 120 125	
gcc tct gac agc aac gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc	432
Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly	
130 135 140	
atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa gat ggc agc ccc cgg act ggg	480
Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly	
145 150 155 160	
cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac tca cac aac	528
Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn	
165 170 175	
gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag	576
Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys	
180 185 190	
gac atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct	624
Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser	
195 200 205	
gtg gag ggc agc tgt ggc ttc taa	648
Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe	
210 215	

FIGURA 10

```

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

Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu
100    105    110
Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly
115    120    125
Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly
130    135    140
Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly
145    150    155    160
Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn
165    170    175
Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys
180    185    190
Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser
195    200    205
Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210    215

```

FIGURA 11