

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 981**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2011 PCT/EP2011/050415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11086138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2011 E 11700144 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2523975**

54 Título: **Cepa hospedadora bacteriana que comprende un gen spr mutante y un gen Tsp de tipo silvestre**

30 Prioridad:

14.01.2010 GB 201000590

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

12.03.2020

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels , BE**

72 Inventor/es:

**ELLIS, MARK y
HUMPHREYS, DAVID PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 747 981 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa hospedadora bacteriana que comprende un gen spr mutante y un gen Tsp de tipo silvestre

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

5 **Antecedentes de la invención**

Las células bacterianas, tales como *E. coli*, se usan comúnmente para producir proteínas recombinantes. El uso de células bacterianas, tales como *E. coli*, tiene muchas ventajas para producir proteínas recombinantes, particularmente debido a la naturaleza versátil de las células bacterianas como células hospedadoras lo que permite la inserción de genes a través de plásmidos. Se ha estado utilizando *E. coli* para producir muchas proteínas recombinantes, incluyendo la insulina humana.

A pesar de las muchas ventajas del uso de células bacterianas para producir proteínas recombinantes, todavía existen limitaciones significativas que incluyen la tendencia de las células bacterianas a la lisis durante la expresión de una proteína recombinante de interés. Este fenotipo de lisis se puede observar en células bacterianas de tipo silvestre y también en células modificadas genéticamente, tales como células que carecen de proteasas bacterianas. Las proteasas tienen un papel importante en la renovación de proteínas viejas, dañadas o mal plegadas en el periplasma y el citoplasma de *E. coli*. Las proteasas bacterianas actúan degradando la proteína recombinante de interés, lo que frecuentemente reduce significativamente el rendimiento de la proteína activa. Por lo tanto, la reducción de la actividad proteasa es deseable para reducir la proteólisis de proteínas de interés. Sin embargo, las cepas bacterianas que carecen de proteasas, como Tsp (también conocida como Prc), también muestran lisis celular.

Tsp (también conocida como Prc) es una proteasa periplásmica de 60 kDa. La reducción de la actividad de Tsp (prc) es deseable para reducir la proteólisis de proteínas de interés. Sin embargo, se ha encontrado que las células que carecen de la proteasa prc muestran un crecimiento termosensible con baja osmolaridad. Hara et al. aislaron cepas carentes de Tsp que eran revertientes termorresistentes que contenían mutaciones supresoras extragenéticas (spr) (Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). Spr es una proteasa periplásmica unida a la membrana de 18 kDa y los sustratos de spr son Tsp y peptidoglucanos en la membrana externa, que participan en la hidrólisis de la pared celular durante la división celular. El gen spr se designa como UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (SPR_ECOLI). Las cepas bacterianas carentes de proteasa que son portadoras de un gen spr mutante, se han descrito en Chen et al. (Chen C, Snedecor B, Nishihara JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Champion KM. *Biotechnol Bioeng.* 5 de marzo de 2004; 85(5): 463-74) que describe la construcción de cepas de *E. coli* que son portadoras de diferentes combinaciones de mutaciones en prc (Tsp) y otra proteasa, DegP, creada al amplificar las regiones aguas arriba y aguas abajo del gen y ligándolas entre sí en un vector que comprende marcadores de selección y una mutación sprW174R

Sorprendentemente, se ha descubierto que una célula bacteriana gram-negativa que es portadora de un gen spr mutante y un gen Tsp de tipo silvestre, proporciona una célula que tiene una lisis reducida. Por consiguiente, los presentes inventores han proporcionado una nueva cepa que tiene propiedades ventajosas para producir una proteína de interés.

Era sorprendente que las células de acuerdo con la presente invención mostrasen un fenotipo de crecimiento y un rendimiento proteico ventajoso porque se sabe que spr y Tsp son supresores mutuos y, por lo tanto, se hubiera previsto que si se permite que uno domine, la célula podría mostrar un fenotipo de poco crecimiento, tal como volverse porosa o mostrar una mayor propensión a la lisis celular. Sin embargo, las células de la presente invención mostraban una reducción significativa del fenotipo de lisis celular en comparación con las células de tipo silvestre y las células que comprendían un gen Tsp mutado por inactivación.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr mutante capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado, en donde el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación en el aminoácido H145 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un gen Tsp cromosómico de tipo silvestre no recombinante, y en donde la célula de acuerdo con esto es isogénica al genoma de una célula bacteriana de tipo silvestre, exceptuando el gen spr mutado.

Las células proporcionadas por la presente invención muestran fenotipos ventajosos de crecimiento y de producción de proteínas.

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

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra el crecimiento de MXE012 y MXE017, en comparación con W3110 de tipo silvestre y MXE001.
- 5 La Figura 2 muestra la expresión del Fab' anti-TNF α en MXE012 y MXE017, en comparación con la de W3110 de tipo silvestre y MXE001.
- La Figura 3 muestra el perfil de crecimiento de W3110 y MXE012 durante una fermentación que produce Fab' anti-TNF α .
- 10 La Figura 4 muestra una acumulación periplásmica de Fab' anti-TNF α (líneas continuas y símbolos negros) y una acumulación de Fab' en el medio (líneas discontinuas y símbolos blancos) para W3110 y MXE012 (W3110 spr H119A) durante una fermentación productora de Fab' anti-TNF α .
- La Figura 5 muestra el perfil de crecimiento de las cepas que expresan Fab' anti-TNF α , W3110 y MXE012 y de las cepas que expresan Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante, W3110 y MXE012.
- 15 La Figura 6 muestra el rendimiento de Fab' anti-TNF α procedente del periplasma (símbolos sombreados) y del material sobrenadante (símbolos blancos sin sombrear) de las cepas que expresan Fab' anti-TNF α , W3110 y MXE012 y de las cepas que expresan Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante, W3110 y MXE012.
- La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de ADNds de las cepas W3110, MXE001, MXE008 y MXE012.
- La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de proteínas de las cepas W3110, MXE001, MXE008 y MXE012.
- 20 La Figura 9a muestra el extremo 5' de las secuencias de proteínas y genes de ptr (proteasa III) de tipo silvestre y de ptr (proteasa III) mutada por inactivación.
- La Figura 9b muestra el extremo 5' de las secuencias de proteínas y genes de Tsp de tipo silvestre y de Tsp mutada por inactivación.
- 25 La Figura 9c muestra una región de las secuencias de proteínas y genes de DegP de tipo silvestre y de DegP mutada.
- La Figura 10 muestra la construcción de un vector para uso en la producción de una célula de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La Figura 11 muestra los perfiles de crecimiento de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante.
- 30 La Figura 12 muestra los títulos de Fab' anti-TNF α de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante.
- La Figura 13 muestra las viabilidades de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante.
- 35 La Figura 14 muestra los perfiles de crecimiento de fermentaciones de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante.
- La Figura 15 muestra los títulos de Fab' anti-TNF α de fermentaciones de 3000 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNF α y DsbC recombinante.

Breve descripción de las secuencias

- 40 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN del gen Tsp de tipo silvestre que incluye los 6 nucleótidos ATGAAC aguas arriba del codón de inicio.
- SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Tsp de tipo silvestre.
- SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ADN de un gen Tsp mutado por inactivación que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codón de inicio.
- SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ADN del gen de la Proteasa III de tipo silvestre.
- 45 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Proteasa III de tipo silvestre.
- SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN de un gen de la Proteasa III mutado por inactivación.

ES 2 747 981 T3

- SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN del gen DegP de tipo silvestre.
- SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína DegP de tipo silvestre.
- SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ADN de un gen DegP mutado.
- SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de una proteína DegP mutada.
- 5 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF.
- SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF.
- SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF.
- 10 SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF.
- SEQ ID NO: 15 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.
- SEQ ID NO: 16 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen Tsp mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.
- 15 SEQ ID NO: 17 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen de la Proteasa III mutada que comprende el sitio de restricción Ase I.
- SEQ ID NO: 18 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen de la Proteasa III mutada que comprende el sitio de restricción Ase I.
- SEQ ID NO: 19 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 5' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.
- 20 SEQ ID NO: 20 es la secuencia del cebador oligonucleotídico 3' para la región del gen DegP mutado que comprende el sitio de restricción Ase I.
- SEQ ID NO: 21 es la secuencia del gen spr de tipo silvestre que incluye la secuencia señal que comprende los 26 primeros residuos de aminoácidos. SEQ ID NO: 22 es la secuencia del gen spr no mutado sin la secuencia señal.
- 25 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia de OmpT mutada que comprende las mutaciones D210A y H212A.
- SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de una secuencia de OmpT mutada que comprende las mutaciones D210A y H212A.
- 30 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia de OmpT mutada por inactivación.
- SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de DsbC marcada con his.
- SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de DsbC marcada con his.
- SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH1 de hTNF40.
- 35 SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH2 de hTNF40, que es una CDR híbrida en la que los seis aminoácidos C-terminales son de la secuencia de la CDR H2 de un anticuerpo de la línea germinal del subgrupo 3 humano y los cambios de aminoácidos resultantes de esta hibridación se subrayan de la siguiente manera: WINTYIGEPI YADSVKG.
- SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de hTNF40.
- SEQ ID NO: 31 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL1 de hTNF40.
- 40 SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL2 de hTNF40.
- SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL3 de hTNF40.
- SEQ ID NO: 34 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de hTNF40.
- SEQ ID NO: 35 muestra la secuencia del adaptador de oligonucleótidos OmpA.

SEQ ID NO: 36 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 1 (IGS1) para la expresión de Fab en *E. coli*.

SEQ ID NO: 37 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 2 (IGS2) para la expresión de Fab en *E. coli*.

5 SEQ ID NO: 38 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 3 (IGS3) para la expresión de Fab en *E. coli*.

SEQ ID NO: 39 muestra el casete de oligonucleótidos que codifica la secuencia intergénica 4 (IGS4) para la expresión de Fab en *E. coli*.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

10 La presente invención proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante adecuada para expresar una proteína de interés que comprende un gen spr mutado y un gen Tsp cromosómico de tipo silvestre no recombinante.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las células que son portadoras de una spr mutada y una Tsp cromosómica de tipo silvestre no recombinante muestran un fenotipo de crecimiento celular mejorado y de lisis celular reducida, en comparación con una célula de tipo silvestre o una célula que comprende un gen Tsp mutado.

15 Además, en una realización, las células que son portadoras de una spr mutante y una Tsp cromosómica de tipo silvestre no recombinante, muestran un rendimiento incrementado de una proteína recombinante de interés, en comparación con una célula bacteriana de tipo silvestre o una célula que comprende un gen Tsp mutado. El rendimiento proteico mejorado puede ser el rendimiento de proteína periplásmica y/o el rendimiento de proteína en el material sobrenadante. En una realización, las células de la presente invención muestran un rendimiento proteico periplásmico mejorado, en comparación con una célula de tipo silvestre, debido a una fuga reducida desde la célula. Las células bacterianas recombinantes son capaces de una expresión prolongada de una proteína recombinante de interés, debido a la reducción de la lisis celular.

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

25 Un inconveniente asociado con las cepas conocidas modificadas genéticamente, tales como las cepas bacterianas carentes de proteasa, creadas previamente y utilizadas para expresar proteínas recombinantes, implica el uso de mutaciones de genes implicados en el metabolismo celular y la replicación del ADN, como por ejemplo, *phoA*, *fhuA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* y *pro* en cepas de *E. coli*. Estas mutaciones pueden tener muchos efectos nocivos sobre la célula hospedadora, incluyendo efectos sobre el crecimiento celular, la estabilidad, el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes y la toxicidad. Las cepas que tienen una o varias de estas mutaciones genómicas, particularmente las cepas que tienen un gran número de estas mutaciones, pueden mostrar una pérdida de capacidad, lo que reduce la tasa de crecimiento bacteriano a un nivel que no es adecuado para una producción de proteínas a nivel industrial. Además, cualquiera de las mutaciones genómicas anteriores puede afectar a otros genes en *cis* y/o en *trans* de una manera nociva impredecible, alterando de este modo el fenotipo, la capacidad y el perfil proteico de la cepa. Además, el uso de células muy mutadas generalmente no es adecuado generalmente para producir proteínas recombinantes para uso comercial, particularmente terapéuticas, porque tales cepas generalmente tienen rutas metabólicas defectuosas y, por lo tanto, pueden crecer poco o nada en medios mínimos o definidos químicamente.

30 En una realización preferida de la invención, las células son portadoras en el genoma solo de las mutaciones mínimas requeridas para introducir el mutante spr. En esta realización, el genoma de la célula bacteriana solo difiere del genoma de una célula bacteriana de tipo silvestre, por una o varias mutaciones en el gen spr y no es portador de ninguna otra mutación que pueda tener efectos nocivos sobre el crecimiento de la célula y/o la capacidad para expresar una proteína de interés. Por consiguiente, una o varias de las células hospedadoras recombinantes de acuerdo con la presente invención pueden mostrar una expresión proteica mejorada y/o características de crecimiento mejoradas, en comparación con las células que comprenden mutaciones por modificación genética adicionales en la secuencia genómica. Las células proporcionadas en la presente invención también son más adecuadas para un uso en la producción de proteínas terapéuticas, en comparación con las células que comprenden alteraciones adicionales del genoma celular.

35 40 La presente invención también proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr mutante, en donde el genoma de la célula es isogénico al genoma de una célula bacteriana de tipo silvestre, a excepción del gen spr mutado. En ese aspecto de la presente invención, la célula es portadora de un gen Tsp de tipo silvestre. El gen Tsp cromosómico de tipo silvestre es preferiblemente un gen Tsp cromosómico no recombinante.

55 El experto en la materia podría fácilmente someter a ensayo un clon de células candidato para ver si tiene el rendimiento deseado de una proteína de interés, utilizando métodos bien conocidos en la técnica que incluyen un

método de fermentación, ELISA y hplc con proteína G. Los métodos de fermentación adecuados se describen en Humphreys D P, *et al.* (1997). Formation of dimeric Fabs in *E. coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. *J. IMMUNOL. METH.* 209: 193-202; Backlund E. Reeks D. Markland K. Weir N. Bowering L. Larsson G. Fedbatch design for periplasmic product retention in *Escherichia coli*, *Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't Journal of Biotechnology.* 135(4):358-65, 2008 Jul 31; Champion KM. Nishihara JC. Joly JC. Arnott D. Similarity of the *Escherichia coli* proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes. [*Journal Article*] *Proteomics.* 1(9):1133-48, 2001 Sep; and Horn U. Strittmatter W. Krebber A. Knupfer U. Kujau M. Wenderoth R. Muller K. Matzku S. Pluckthun A. Riesenberg D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, *Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't Applied Microbiology & Biotechnology.* 46(5-6):524-32, 1996 Dec. La persona experta también podría analizar fácilmente la proteína secretada para ver si la proteína está plegada correctamente, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC con proteína G, difracción circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medición por afinidad con epítopos.

En una realización preferida de la presente invención, la célula comprende además un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

La presente invención se describirá ahora con más detalle.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en esta memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. El término "péptido" se refiere a 10 aminoácidos o menos.

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

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debe interpretarse como "que incluye".

La célula no mutada o célula de control en el contexto de la presente invención significa una célula del mismo tipo que la célula gram-negativa recombinante de la invención, en donde la célula no se ha modificado para ser portadora del gen spr mutante. Por ejemplo, una célula no mutada puede ser una célula de tipo silvestre y se puede obtener a partir de la misma población de células hospedadoras que las células de la invención antes de la modificación para introducir cualquier mutación.

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

La expresión "fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado" en el contexto de la presente invención, significa el fenotipo mostrado por una célula que alberga un gen Tsp mutante. Normalmente, las células que comprenden un gen Tsp mutante se pueden lisar, especialmente con altas densidades celulares. La lisis de estas células provoca que cualquier proteína recombinante se escape al material sobrenadante. Las células que son portadoras del gen Tsp mutado también pueden mostrar un crecimiento termosensible con baja osmolaridad. Por ejemplo, las células que muestran una tasa de crecimiento nula o reducida o las células que mueren en medios hipotónicos a una temperatura alta, tal como a 40°C o más.

El término "isogénico" en el contexto de la presente invención, significa que el genoma de la célula de la presente invención tiene sustancialmente la misma secuencia o la misma secuencia genómica, en comparación con la célula de tipo silvestre a partir de la cual se obtiene la célula, exceptuando el gen spr mutado. En esta realización, el genoma de la célula de acuerdo con la presente invención no comprende más mutaciones no naturales o modificadas genéticamente. En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención puede tener sustancialmente la misma secuencia genómica que en comparación con la célula de tipo silvestre, exceptuando el gen spr mutado, teniendo en cuenta que puede tener lugar cualquier mutación natural. En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención puede tener exactamente la misma secuencia genómica que en comparación con la célula de tipo silvestre, exceptuando el gen spr mutado.

En la realización de la presente invención en la que la célula comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC, el polinucleótido que codifica DsbC puede estar presente en un vector de expresión adecuado, transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula hospedadora. En la realización en la que el polinucleótido que codifica DsbC se inserta en el genoma del hospedador, la célula de la presente invención también diferirá de una célula de tipo silvestre debido a la secuencia del polinucleótido insertado que codifica la DsbC. Preferiblemente, el polinucleótido que codifica DsbC está en un vector de expresión en la célula, causando de este modo una alteración mínima en el genoma de la célula hospedadora.

La expresión "tipo silvestre" en el contexto de la presente invención, significa una cepa de una célula bacteriana gram-negativa, tal y como puede estar presente en la naturaleza o se puede aislar del entorno, la cual no es portadora de ninguna mutación por modificación genética. Un ejemplo de una cepa de tipo silvestre de *E. coli* es W3110, tal como la cepa W3110 K-12.

Se puede usar cualquier bacteria gram-negativa adecuada como célula parental para producir la célula recombinante de la presente invención. Una bacteria gram-negativa adecuada incluye *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *E. coli*. Preferiblemente la célula parental es *E. coli*. Cualquier cepa adecuada de *E. coli* se puede usar en la presente invención, pero preferiblemente se usa una cepa W3110 de tipo silvestre, tal como K-12 W3110.

En una realización preferida, la célula es isogénica a una célula de *E. coli* de tipo silvestre, tal como W3110, a excepción del gen spr mutado.

En una realización, la célula de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica la proteína de interés. En esa realización, el polinucleótido que codifica la proteína de interés puede estar contenido dentro de un vector de expresión adecuado, transformado en la célula y/o integrado en el genoma de la célula hospedadora. En la realización en la que el polinucleótido que codifica la proteína de interés se inserta en el genoma del hospedador, el genoma de la presente invención también diferirá de una célula de tipo silvestre debido a la secuencia de polinucleótido insertada que codifica la proteína de interés. Preferiblemente, el polinucleótido está en un vector de expresión en la célula, causando de este modo una alteración mínima en el genoma de la célula hospedadora.

Las células de acuerdo con la presente invención son portadoras de un gen Tsp de tipo silvestre. En un aspecto de la presente invención, las células son portadoras de un gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre. El gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre se refiere a un gen Tsp cromosómico que no se ha construido, producido o insertado en el cromosoma utilizando tecnología de ADN recombinante.

Tal y como se usa en esta memoria, "gen Tsp" significa un gen que codifica una proteasa Tsp (también conocida como Prc) que es una proteasa periplásmica capaz de actuar sobre la proteína 3 que se une a la penicilina (PBP3) y las proteínas de la cola del fago. La secuencia del gen Tsp de tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la proteína Tsp de tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 2.

La proteína spr es una proteasa periplásmica unida a la membrana de 18 kDa y los sustratos de spr son Tsp y peptidoglicanos en la membrana externa que participan en la hidrólisis de la pared celular durante la división celular.

La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de la proteína spr se muestra en SEQ ID NO: 21 con la secuencia señal en el extremo N-terminal y en SEQ ID NO: 22 sin la secuencia señal de 26 aminoácidos (de acuerdo con el número de orden de UniProt, P0AFV4). La numeración de los aminoácidos de la secuencia de la proteína spr en la presente invención incluye la secuencia señal. En consecuencia, el aminoácido 1 de la proteína spr es el primer aminoácido (Met) que se muestra en SEQ ID NO: 21.

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

El gen spr mutado codifica una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Las células que son portadoras del gen Tsp mutado pueden tener una buena tasa de crecimiento celular, pero una limitación de esas células es su tendencia a lisarse, especialmente a altas densidades celulares. Por consiguiente, el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado es una tendencia a la lisis, especialmente a altas densidades celulares. Las células que son portadoras de un gen Tsp mutado también muestran un crecimiento termosensible con baja osmolaridad. Sin embargo, las mutaciones de spr transportadas por las células de la presente invención, cuando se introducen en una célula que es portadora de un gen Tsp mutado, suprimen el fenotipo de Tsp mutante y, por lo tanto, la célula muestra una lisis reducida, particularmente a una alta densidad celular. El fenotipo de crecimiento de una célula puede ser medido fácilmente por una persona experta en la técnica durante una técnica de fermentación en matraz de agitación o de alta densidad celular. La supresión del fenotipo de lisis celular se puede observar a partir de la tasa de crecimiento mejorada y/o la producción de proteínas recombinantes, particularmente en el periplasma, mostradas por una célula que es portadora del mutante spr y el mutante Tsp, en comparación con una célula que es portadora del mutante Tsp y una spr de tipo silvestre.

Se puede hacer cualquier mutación o mutaciones adecuadas en el gen spr que dan como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Esta actividad puede ser sometida a ensayo por una persona experta en la técnica, creando una célula que sea portadora de un gen spr mutante y un gen Tsp mutante y comparando el fenotipo con una célula que solo sea portadora del gen Tsp mutante. Las mutaciones adecuadas para el gen Tsp se describen con detalle a continuación. Una referencia a un gen Tsp mutado o un gen Tsp mutado que codifica Tsp, se refiere a un gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida o un gen Tsp mutado por inactivación, a menos que se indique lo contrario.

La expresión "gen Tsp mutado que codifica una proteína Tsp que tiene una actividad proteasa reducida" significa que el gen Tsp mutado no tiene la actividad proteasa completa, en comparación con el gen Tsp no mutado de tipo silvestre. El gen Tsp mutado puede codificar una proteína Tsp que tiene 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos o 5% o menos de la actividad proteasa de una proteína Tsp no mutada de tipo silvestre. El gen Tsp mutado puede codificar una proteína Tsp que no tiene actividad proteasa. La célula no carece de Tsp cromosómica, es decir, la secuencia del gen Tsp no se ha deleciónado ni mutado para evitar la expresión de cualquier forma de la proteína Tsp.

Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen Tsp con el fin de producir una proteína que tenga una actividad proteasa reducida. Una persona experta en la técnica puede evaluar fácilmente la actividad proteasa de una proteína Tsp expresada a partir de una bacteria gram-negativa mediante cualquier método adecuado en la técnica, tal como el método descrito en Keiler et al. (Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 270, nº 48, Issue of December 1, pp. 28864-28868, 1995 Kenneth C. Keiler and Robert T. Sauer) en donde se sometió a ensayo la actividad proteasa de Tsp.

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

Por consiguiente, el gen Tsp mutado puede comprender:

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

Uno o varios de S430, D441, K455, G375, G376, E433 y T452 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga una actividad proteasa reducida. Ejemplos de mutaciones adecuadas son S430A, S430C, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A y T452A. El gen Tsp mutado puede comprender una, dos o tres mutaciones en los residuos del sitio activo, por ejemplo, el gen puede comprender:

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

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

La expresión "gen Tsp mutado por inactivación" significa que el gen comprende una o varias mutaciones, lo que causa que no se produzca una expresión de la proteína codificada por el gen para proporcionar una célula que carece de la proteína codificada por el gen mutado por inactivación. El gen inactivado se puede transcribir parcial o completamente pero no se puede traducir en la proteína codificada. El gen Tsp mutado por inactivación se puede mutar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante una o varias mutaciones por delección, inserción, puntual, de sentido erróneo, sin sentido y de cambio de marco de lectura, para causar la falta de expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen se puede inactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN extraño, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia que codifica el gen.

El gen Tsp mutado puede comprender una mutación en el codón de inicio del gen y/o en uno o varios codones de detención situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de detención del gen, evitando de este modo una expresión de la proteína Tsp. La mutación en el codón de inicio puede ser una mutación de sentido erróneo de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de inicio. Alternativa o adicionalmente, el codón de inicio se puede mutar mediante una mutación por inserción o delección con desplazamiento del marco de lectura. El gen Tsp comprende dos codones ATG en el extremo 5' de la secuencia codificadora, uno o ambos codones ATG se pueden mutar con una mutación de sentido erróneo. El gen Tsp se puede mutar en el segundo codón ATG (codón 3) a TCG, como se muestra en la Figura 9b. El gen Tsp puede comprender de forma alternativa o adicional uno o varios codones de detención situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de detención del gen. Preferiblemente, el gen Tsp mutado por inactivación comprende tanto una mutación de sentido erróneo del codón de inicio como uno o varios codones de detención insertados. El gen Tsp se puede mutar para eliminar "T" del

quinto codón, causando de este modo un desplazamiento del marco de lectura que produce codones de detención en los codones 11 y 16, como se muestra en la Figura 9b. El gen Tsp se puede mutar para insertar un sitio de restricción Ase I para crear un tercer codón de detención en marco en el codón 21, como se muestra en la Figura 9b.

5 El gen Tsp mutado por inactivación puede tener la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3, que incluye los 6 nucleótidos ATGAAT aguas arriba del codón de inicio. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia de Tsp mutada por inactivación de SEQ ID NO: 3 se muestran en la Figura 9b. En una realización, el gen Tsp mutado tiene la secuencia de ADN desde los nucleótidos 7 a 2048 de SEQ ID NO: 3.

10 Por consiguiente, una vez que se ha identificado una célula que es portadora de un gen Tsp mutante adecuado, se pueden identificar mutaciones adecuadas del gen spr que dan como resultado una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

15 En esta memoria se describen células que comprenden un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147, H157 y W174, más preferiblemente en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147, H157 y W174. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales. Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147 y H157, más preferiblemente en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 y H157. En este ejemplo, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales.

20 Preferiblemente, el gen spr mutante codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147, más preferiblemente en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. En este ejemplo, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales.

25 En esta memoria se describe una célula bacteriana gram-negativa que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr que tiene una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 y H157, preferiblemente en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de S95, V98, Y115, D133, V135 y G147, y en donde la célula comprende un gen Tsp de tipo silvestre. En este ejemplo, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales.

30 El gen Tsp cromosómico de tipo silvestre es preferiblemente un gen Tsp cromosómico no recombinante. Preferiblemente, la célula comprende además un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

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

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

40 En consecuencia, el gen spr mutado puede comprender:

- una mutación en C94; o
- una mutación en H145; o
- una mutación en H157; o
- una mutación en C94 y H145; o
- 45 • una mutación en C94 y H157; o
- una mutación en H145 y H157; o
- una mutación en C94, H145 y H157.

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

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

la proteína spr puede tener una, dos o tres de las mutaciones C94A, H145A y H157A. Preferiblemente, el gen spr comprende la mutación de sentido erróneo H145A, que se ha observado que produce una proteína spr capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado.

5 La denominación de un mutante por sustitución en esta memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína de tipo silvestre. El número se refiere a la posición del aminoácido en donde se está haciendo la sustitución de un aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se usa para reemplazar al aminoácido de tipo silvestre.

10 Además, en esta memoria se describe la proteína spr mutante que comprende una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147, preferiblemente una mutación en uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de S95, V98, Y115, D133, V135 y G147. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales. En consecuencia, el gen spr mutado puede comprender:

- una mutación en N31; o
- una mutación en R62; o
- 15 • una mutación en I70; o
- una mutación en Q73; o
- una mutación en S95; o
- una mutación en V98; o
- una mutación en Q99; o
- 20 • una mutación en R100; o
- una mutación en L108; o
- una mutación en Y115; o
- una mutación en D133; o
- una mutación en V135; o
- 25 • una mutación en L136; o
- una mutación en G140; o
- una mutación en R144; o
- una mutación en G147.

En un ejemplo, la proteína spr mutante comprende múltiples mutaciones en los aminoácidos:

- 30 • S95 e Y115; o
- N31, Q73, R100 y G140; o
- Q73, R100 y G140; o
- R100 y G140; o
- Q73 y G140; o
- 35 • Q73 y R100; o
- R62, Q99 y R144; o
- Q99 y R144.

Uno o varios de los aminoácidos N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 y G147 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína spr capaz de

suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen Tsp mutado. Por ejemplo, uno o varios de N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140 y R144 se pueden mutar a un aminoácido pequeño tal como Gly o Ala.

5 En una descripción adicional, la proteína spr comprende una o varias de las siguientes mutaciones: N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C. Preferiblemente, la proteína spr comprende una o varias de las siguientes mutaciones: S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D o V135G y G147C. En este ejemplo, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales.

10 En un ejemplo, la proteína spr tiene una mutación seleccionada a partir de N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D o V135G, L136P, G140C, R144C y G147C. En esta realización, la proteína spr preferiblemente no tiene mutaciones adicionales.

En una realización adicional, la proteína spr tiene múltiples mutaciones seleccionadas a partir de:

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

20 En una descripción, la proteína spr tiene la mutación W174R. En una descripción alternativa, la proteína spr no tiene la mutación W174R.

En una realización preferida, la célula de acuerdo con la presente invención comprende el gen spr mutado y un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

25 Tal y como se usa en esta memoria, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o se produce usando tecnología de ADN recombinante. La secuencia polinucleotídica que codifica DsbC puede ser idéntica a la secuencia endógena que codifica DsbC que se encuentra en las células bacterianas. Alternativamente, la secuencia polinucleotídica recombinante que codifica DsbC es una versión mutada de la secuencia de DsbC de tipo silvestre, por ejemplo, tiene un sitio de restricción eliminado, tal como un sitio EcoRI, y/o una secuencia que codifica un marcador his. Un ejemplo de secuencia de nucleótidos de DsbC modificada para uso en la presente

30 invención se muestra en SEQ ID NO: 26, que codifica la secuencia de aminoácidos de DsbC marcada con his mostrada en SEQ ID NO: 27.

35 En un aspecto de la presente invención, se proporciona una célula bacteriana gram-negativa que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr mutante, un polinucleótido recombinante que codifica DsbC y en donde la célula comprende un gen Tsp de tipo silvestre. El gen Tsp de tipo silvestre es preferiblemente un gen Tsp cromosómico no recombinante.

DsbC es una proteína procariota que se encuentra en el periplasma de *E. coli* que cataliza la formación de enlaces disulfuro en *E. coli*. DsbC tiene una longitud de secuencia de aminoácidos de 236 (incluido el péptido señal) y un peso molecular de 25,6 KDa (nº de UniProt P0AEG6). DsbC se identificó por primera vez en 1994 (Missiakas et al. The Escherichia coli dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation, The EMBO Journal vol 13, nº 8, p 2013-2020, 1994 y Shevchik et al. Characterization of DsbC, a periplasmic protein of Erwinia chrysanthemi and Escherichia coli with disulfide isomerase activity, The EMBO Journal vol 13, nº 8, p 2007-2012, 1994).

40

45 Se sabe que se coexpresan proteínas que catalizan la formación de enlaces disulfuro para mejorar la expresión de proteínas en una célula hospedadora. El documento WO98/56930 describe un método para producir polipéptidos heterólogos que contienen enlaces disulfuro en células bacterianas en donde una disulfuro isomerasa procariota, tal como DsbC o DsbG, se coexpresa con un polipéptido eucariota. El documento US6673569 describe un operón artificial que comprende polinucleótidos que codifican cada una de DsbA, DsbB, DsbC y DsbD para uso en la producción de una proteína extraña. El documento EP0786009 describe un procedimiento para producir un polipéptido heterólogo en bacterias en donde se induce la expresión de un ácido nucleico que codifica DsbA o DsbC

50 antes de la inducción de la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo.

5 Hemos encontrado que la combinación específica de la expresión de un polinucleótido recombinante que codifica DsbC en una célula bacteriana que comprende un gen spr mutado y un gen Tsp de tipo silvestre, proporciona un hospedador mejorado para expresar proteínas de interés. Sorprendentemente, se descubrió que las nuevas cepas muestran una mayor tasa de crecimiento celular y una duración incrementada de la supervivencia celular, en comparación con una célula de tipo silvestre o una célula que comprende un gen Tsp mutado. Específicamente, las células que son portadoras de un gen DsbC recombinante, una mutación de spr y una Tsp de tipo silvestre, muestran un fenotipo de lisis celular reducido en comparación con las células que son portadoras de un gen Tsp mutado.

10 En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención también expresa una o varias proteínas adicionales del modo siguiente:

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

Una o varias de las proteínas anteriores se pueden integrar en el genoma de la célula y/o insertar en un vector de expresión.

20 En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención no comprende un polinucleótido recombinante que codifica una o varias de las siguientes proteínas adicionales:

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

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

35 En una realización, la presente invención proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende

- a. un gen spr mutado;
- b. un gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre; y
- c. un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida y/o una OmpT mutada en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen OmpT mutado por inactivación.

40 Preferiblemente en esta realización, la célula es isogénica a una célula bacteriana de tipo silvestre, exceptuando las mutaciones anteriores.

En una realización, la presente invención proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende:

- a. un gen spr mutado;
- 45 b. un gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre; y
- c. un gen ptr mutado en donde el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado por inactivación y/o una OmpT mutada en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen OmpT mutado por inactivación.

Preferiblemente en esta realización, la célula es isogénica a una célula bacteriana de tipo silvestre, exceptuando las mutaciones anteriores.

En una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende

- a. un gen spr mutado;
- 5 b. un gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre; y
- c. un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida;
- d. un gen ptr mutado en donde el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen ptr mutado por inactivación; y
- 10 e. opcionalmente un OmpT mutado en donde el gen OmpT mutado codifica una proteína OmpT que tiene una actividad proteasa reducida o es un gen OmpT mutado por inactivación.

Preferiblemente en esta realización, la célula es isogénica a una célula bacteriana de tipo silvestre, exceptuando las mutaciones anteriores.

15 En una realización de la presente invención, la célula es portadora de un gen DegP mutado. Tal y como se usa en esta memoria, "DegP" significa un gen que codifica una proteína DegP (también conocida como HtrA), que tiene una función doble como chaperona y una proteasa (Families of serine peptidases; Rawlings ND, Barrett AJ. *Methods Enzymol.* 1994; 244:19-61). La secuencia del gen DegP no mutado se muestra en SEQ ID NO: 7 y la secuencia de la proteína DegP no mutada se muestra en SEQ ID NO: 8.

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

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

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

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

40 Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen DegP para producir una proteína que tenga actividad chaperona y actividad proteasa reducida. Una persona experta en la técnica puede evaluar fácilmente la actividad proteasa y chaperona de una proteína DegP expresada a partir de una bacteria gram-negativa mediante cualquier método adecuado, tal como el método descrito en Spiess et al., en el que se someten a ensayo las actividades proteasa y chaperona de DegP en MalS, un sustrato natural de DegP (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell*, Volume 97, Issue 3, Pages 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) y también el método descrito en The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures, Skorko-Glonek J et al. *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658.

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

En consecuencia, el gen DegP mutado puede comprender:

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

10 Uno, dos o tres entre His105, Asp135 y Ser210 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga actividad chaperona y actividad proteasa reducida. Por ejemplo, uno, dos o tres entre His105, Asp135 y Ser210 se pueden mutar a un aminoácido pequeño tal como Gly o Ala. Otra mutación adecuada es cambiar uno, dos o tres entre His105, Asp135 y Ser210 a un aminoácido que tenga propiedades opuestas, tal como mutar Asp135 a Lys o Arg, mutar His105 polar a un aminoácido no polar como Gly, Ala, Val o Leu y mutar Ser210 hidrófila pequeña a un residuo grande o hidrófobo como Val, Leu, Phe o Tyr. Preferiblemente, el gen DegP comprende la mutación puntual S210A, como se muestra en la Figura 9c, que se ha observado que produce una proteína que tiene actividad chaperona pero no actividad proteasa (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Volume 97, Issue 3, Pages 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

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

El gen DegP mutado también puede comprender un sitio de restricción silencioso no natural, tal como Ase I, para ayudar en la identificación y los métodos de escrutinio, por ejemplo, como se muestra en la Figura 9c.

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

35 En las realizaciones de la presente invención en las que la célula comprende un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida, una o varias de las células proporcionadas por la presente invención pueden proporcionar un rendimiento mejorado de proteínas plegadas correctamente procedentes de la célula, en relación con las células mutadas en las que el gen DegP ha sido mutado para inactivar DegP, evitando la expresión de DegP, tal como DegP cromosómica carente. En una célula que comprende un gen DegP mutado por inactivación que impide la expresión de DegP, la actividad chaperona de DegP se pierde por completo, mientras que en la célula de acuerdo con la presente invención, la actividad chaperona de DegP se conserva mientras que se pierde la actividad proteasa completa. En esas realizaciones, una o varias células de acuerdo con la presente invención tienen una actividad proteasa más baja para evitar la proteólisis de la proteína mientras que conservan la actividad chaperona para permitir un plegamiento correcto y el transporte de la proteína en la célula hospedadora.

45 El experto en la materia podrá analizar fácilmente la proteína secretada para ver si la proteína está plegada correctamente, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como HPLC con proteína G, dicroísmo circular, RMN, cristalografía de rayos X y métodos de medición por afinidad de epítopos.

50 En esas realizaciones, una o varias células de acuerdo con la presente invención pueden tener un crecimiento celular mejorado en comparación con las células que son portadoras de un gen DegP mutado por inactivación que impide la expresión de DegP. Sin desear estar ligado a una teoría, se puede mostrar un crecimiento celular mejorado debido a la actividad chaperona que conserva la proteasa DegP, que puede aumentar la capacidad de la célula para procesar todas las proteínas que requieren una actividad chaperona. Por consiguiente, la producción de proteínas plegadas correctamente, necesarias para el crecimiento y la reproducción de la célula, se puede aumentar

- 5 en una o varias de las células de la presente invención, en comparación con las células que son portadoras de una mutación por inactivación de DegP, mejorando de este modo las rutas celulares que regulan el crecimiento. Además, cepas conocidas que carecen de la proteasa DegP son generalmente sensibles a la temperatura y normalmente no crecen a temperaturas superiores a aproximadamente 28°C. Sin embargo, las células de acuerdo con la presente invención no son sensibles a la temperatura y se pueden cultivar a temperaturas de 28°C o más, incluidas temperaturas de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C, las cuales se usan normalmente para la producción a escala industrial de proteínas procedentes de bacterias
- 10 En una realización de la presente invención, la célula es portadora de un gen ptr mutado. Tal y como se usa en esta memoria, "gen ptr" significa un gen que codifica la Proteasa III, una proteasa que degrada proteínas de alto peso molecular. La secuencia del gen ptr no mutado se muestra en SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la proteína Proteasa III no mutada se muestra en SEQ ID NO: 5.
- 15 La referencia al gen ptr mutado o al gen ptr mutado que codifica Proteasa III, se refiere o bien a un gen ptr mutado que codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida, o a un gen ptr mutado por inactivación, a menos que se indique lo contrario.
- 20 La expresión "gen ptr mutado que codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida" en el contexto de la presente invención, significa que el gen ptr mutado no tiene la actividad proteasa completa, en comparación con el gen ptr no mutado de tipo silvestre.
- Preferiblemente, el gen ptr mutado codifica una Proteasa III que tiene 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos o 5% o menos de la actividad proteasa de una proteína proteasa III no mutada de tipo silvestre. Más preferiblemente, el gen ptr mutado codifica una proteína Proteasa III que no tiene actividad proteasa. En esa realización, la célula no carece de ptr cromosómico, es decir, la secuencia del gen ptr no se ha deleciónado ni mutado para evitar la expresión de cualquier forma de la proteína Proteasa III.
- 25 Se puede introducir cualquier mutación adecuada en el gen ptr para producir una proteína Proteasa III que tenga una actividad proteasa reducida. La actividad proteasa de una proteína Proteasa III expresada a partir de una bacteria gram-negativa, puede ser sometida a ensayo fácilmente por una persona experta en la técnica mediante cualquier método adecuado en la técnica.
- 30 La expresión "gen ptr mutado por inactivación" en el contexto de la presente invención, significa que el gen comprende una o varias mutaciones, por lo que no se provoca una expresión de la proteína codificada por el gen para proporcionar una célula que carece de la proteína codificada por el gen mutado por inactivación. El gen inactivado se puede transcribir parcial o completamente pero no se puede traducir a la proteína codificada. El gen ptr mutado por inactivación se puede mutar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante una o varias mutaciones por delección, inserción, puntual, de sentido erróneo, sin sentido y de cambio de marco de lectura, para causar una falta de expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen se puede inactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN extraño, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia que codifica el gen.
- 35 En una realización preferida, el gen no se muta mediante la inserción de una secuencia de ADN extraño, tal como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia que codifica el gen. Preferiblemente, el gen de la Proteasa III comprende una mutación en el codón de inicio del gen y/o en uno o varios codones de detención situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de detención del gen, evitando de este modo la expresión de la proteína Proteasa III.
- 40 Una mutación en el codón de inicio del gen diana inactivado causa la pérdida de función del codón de inicio y, por lo tanto, asegura que el gen diana no comprende un codón de inicio adecuado al principio de la secuencia codificante. La mutación del codón de inicio puede ser una mutación de sentido erróneo de uno, dos o los tres nucleótidos del codón de inicio. Alternativa o adicionalmente, el codón de inicio se puede mutar mediante una mutación por inserción o delección con desplazamiento del marco de lectura.
- 45 En una realización preferida, el gen ptr está mutado para cambiar el codón de inicio de ATG a ATT, como se muestra en la Figura 9a.
- 50 El gen ptr mutado por inactivación puede comprender de forma alternativa o adicional uno o varios codones de detención situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de detención del gen. Preferiblemente, el gen ptr mutado por inactivación comprende tanto una mutación de sentido erróneo en el codón de inicio como uno o varios codones de detención insertados.
- 55 El uno o varios codones de detención insertados son preferiblemente codones de detención en marco de lectura. Sin embargo, el uno o varios codones de detención insertados pueden ser, alternativa o adicionalmente, codones de detención fuera del marco de lectura. Se puede requerir que uno o varios codones de detención estén fuera del marco de lectura para detener la traducción cuando un codón de inicio fuera del marco de lectura se cambia a un codón de inicio dentro del marco de lectura mediante una mutación por inserción o delección con desplazamiento del cambio de lectura. El uno o varios codones de detención se pueden introducir a través de cualquier mutación adecuada, incluyendo una mutación puntual de sentido erróneo y una mutación por desplazamiento del marco de

lectura. El uno o varios codones de detención se introducen preferiblemente mediante una mutación por desplazamiento del marco de lectura y/o una mutación por inserción, preferiblemente reemplazando un segmento de la secuencia del gen por una secuencia que comprende un codón de detención. Por ejemplo, se puede insertar un sitio de restricción *Ase I*, que comprende el codón de detención TAA.

- 5 En una realización preferida, el gen *ptr* se muta para insertar un codón de detención en marco de lectura mediante la inserción de un sitio de restricción *Ase I*, como se muestra en la Figura 9a. En una realización preferida, el gen *ptr* mutado por inactivación tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6. Las mutaciones que se han realizado en la secuencia de SEQ ID NO: 6 del gen *ptr* mutado por inactivación se muestran en la Figura 9a.

- 10 Las mutaciones por inactivación descritas anteriormente son ventajosas porque causan una alteración mínima o nula en el ADN cromosómico aguas arriba o aguas abajo del sitio del gen *diana* inactivado y no requieren la inserción y retención de ADN extraño, tal como marcadores de resistencia a los antibióticos, que pueden afectar a la capacidad de las células para expresar una proteína de interés, particularmente proteínas terapéuticas. Por consiguiente, una o varias de las células de acuerdo con la presente invención pueden mostrar características mejoradas de crecimiento y/o de expresión de proteínas, en comparación con las células en las que el gen de la proteasa se ha inactivado mediante la inserción de ADN extraño en la secuencia que codifica el gen.

En una realización, las células de acuerdo con la presente invención son portadoras de un gen *OmpT* mutado. Tal y como se usa en esta memoria, "gen *OmpT*" significa un gen que codifica la proteasa *OmpT* (del inglés "outer membrane protease T") que es una proteasa de la membrana externa. La secuencia del gen *OmpT* no mutado de tipo silvestre es SWISS-PROT P09169.

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

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

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

- 35 *OmpT* ha sido descrita en Kramer et al. (Identification of active site serine and histidine residues in *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT* FEBS Letters 2000 468, 220-224), que describen que la sustitución de serinas, histidinas y residuos ácidos por alaninas da como resultado una actividad reducida en ~10 veces para Glu27, Asp97, Asp208 o His101, una actividad reducida en ~500 veces para Ser99 y una actividad reducida en ~10000 veces para Asp83, Asp85, Asp210 o His212. Vandeputte-Rutten et al. (Crystal Structure of the Outer Membrane Protease *OmpT* from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site, The EMBO Journal 2001, Vol 20 No 18 5033-5039) sugieren que tiene un sitio activo que comprende una pareja Asp83-Asp85 y una pareja His212-Asp210. Además Kramer et al. (Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*, Eur. J. Biochem. FEBS 2002, 269, 1746-1752) describen que las mutaciones D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K/K217G, K217T y R218L en el bucle L4, todas ellas daban lugar a una pérdida parcial o prácticamente completa de la actividad enzimática.

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

- 45 Uno o varios de E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 y E250 se pueden mutar a cualquier aminoácido adecuado que dé como resultado una proteína que tenga una actividad proteasa reducida. Por ejemplo, uno o varios de E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 y E250 se pueden mutar a alanina. Ejemplos de mutaciones adecuadas son E27A, D43A, D83A, D85A, D97A, S99A, H101A, E111A, E136A, E193A, D206A, D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K, K217G, K217T, R218L y E250A. En una realización, el gen *OmpT* mutado comprende las mutaciones D210A y H212A. Una secuencia de *OmpT* mutada adecuada que comprende las mutaciones D210A y

H212A, se muestra en SEQ ID NO: 23.

La expresión "gen OmpT mutado por inactivación" en el contexto de la presente invención significa que el gen comprende una o varias mutaciones, por lo que no se provoca una expresión de la proteína codificada por el gen para proporcionar una célula que carece de la proteína codificada por el gen mutado por inactivación. El gen inactivado se puede transcribir parcial o completamente pero no se traduce la proteína codificada. El gen OmpT mutado por inactivación se puede mutar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante una o varias mutaciones por delección, inserción, puntual, de sentido erróneo, sin sentido y de cambio de marco de lectura, para causar la falta de expresión de la proteína. Por ejemplo, el gen se puede inactivar mediante la inserción de una secuencia de ADN extraño, como un marcador de resistencia a antibióticos, en la secuencia que codifica el gen.

En una realización, el gen OmpT comprende una mutación en el codón de inicio del gen y/o en uno o varios codones de detención situados aguas abajo del codón de inicio del gen y aguas arriba del codón de detención del gen, evitando de este modo la expresión de la proteína OmpT. La mutación en el codón de inicio puede ser una mutación de sentido erróneo de uno, dos o tres nucleótidos del codón de inicio. Alternativa o adicionalmente, el codón de inicio se puede mutar mediante una mutación por inserción o delección con desplazamiento de marco de lectura.

Una secuencia de OmpT mutada por inactivación adecuada se muestra en SEQ ID NO: 24.

En una realización, la célula bacteriana gram-negativa de acuerdo con la presente invención no es portadora de un gen ompT mutado por inactivación, tal como si careciera de ompT cromosómico.

En una realización, la célula bacteriana gram-negativa de acuerdo con la presente invención no es portadora de un gen degP mutado por inactivación, tal como si careciera de degP cromosómico. En una realización, la célula bacteriana gram-negativa de acuerdo con la presente invención, no es portadora de un gen degP mutado.

En una realización, la célula bacteriana gram-negativa de acuerdo con la presente invención no es portadora de un gen ptr mutado por inactivación, tal como si careciera de ptr cromosómico.

Muchas mutaciones por modificación genética, incluidas las mutaciones por inactivación, implican el uso de marcadores de resistencia a antibióticos que permiten la selección e identificación de células mutadas con éxito. Sin embargo, existe una serie de desventajas por el uso de marcadores de resistencia a antibióticos.

En una realización de la presente invención, los genes mutados pueden comprender uno o varios sitios de marcadores de restricción. Por lo tanto, el gen spr y/o un gen DegP mutado que codifica una proteína DegP que tiene actividad chaperona pero no tiene actividad proteasa y/o un gen ptr mutado y/o un gen OmpT mutado, se pueden mutar para comprender uno o varios sitios de marcadores de restricción. Los sitios de restricción están diseñados genéticamente en el gen y no se producen de forma natural. Los sitios de marcadores de restricción son ventajosos porque permiten un escrutinio e identificación de células modificadas correctamente que comprenden las mutaciones cromosómicas requeridas. Las células que se han modificado para ser portadoras de uno o varios de los genes mutados, se pueden analizar mediante una PCR de ADN genómico procedente de lisados celulares, usando parejas de oligonucleótidos diseñados para amplificar una región del ADN genómico que comprende un sitio marcador de restricción que no se produce de forma natural. El ADN amplificado se puede analizar luego mediante electroforesis en gel de agarosa antes y después de una incubación con una enzima de restricción adecuada, capaz de digerir el ADN en el sitio marcador de restricción que no se produce de forma natural. La presencia de fragmentos de ADN después de la incubación con la enzima de restricción, confirma que las células se han modificado con éxito para ser portadoras de uno o varios genes mutados.

En la realización en la que la célula comprende un gen ptr mutado por inactivación que tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6, las secuencias de cebadores oligonucleotídicos mostradas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 se pueden emplear para amplificar la región del ADN que comprende el sitio de restricción de Ase I que no se produce de forma natural, procedente del ADN genómico de células transformadas. El ADN genómico amplificado se puede incubar luego con la enzima de restricción Ase I y analizar mediante electroforesis en gel para confirmar la presencia del gen ptr mutado en el ADN genómico.

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

El uno o varios sitios de restricción se pueden introducir mediante cualquier mutación adecuada, incluyendo una o varias mutaciones por delección, inserción, puntual, de sentido erróneo, sin sentido y de cambio de marco de lectura. Se puede introducir un sitio de restricción mediante la mutación del codón de inicio y/o una mutación para introducir uno o varios codones de detención, como se ha descrito anteriormente. Esta realización es ventajosa porque el sitio marcador de restricción es un marcador directo y único de las mutaciones por inactivación introducidas.

- 5 Se puede insertar un sitio marcador de restricción que comprende un codón de detención en marco de lectura, tal como un sitio de restricción *Ase I*. Esto es particularmente ventajoso porque el sitio de restricción insertado sirve como un sitio marcador de restricción y como codón de detención para evitar una transcripción completa de la secuencia que codifica el gen. Por ejemplo, en la realización en la que se introduce un codón de detención en el gen ptr mediante la introducción de un sitio *Ase I*, esto también crea un sitio de restricción, como se muestra en la Figura 9a.
- 10 Un sitio marcador de restricción se puede insertar mediante una mutación en el codón de inicio y opcionalmente una o varias mutaciones puntuales adicionales. En esta realización, el sitio marcador de restricción es preferiblemente un sitio de restricción *EcoR I*. Esto es particularmente ventajoso porque la mutación en el codón de inicio también crea un sitio marcador de restricción. Por ejemplo, en la realización en la que el codón de inicio del gen ptr se cambia a ATT, esto crea un sitio de marcador *EcoR I*, como se muestra en la Figura 9a.
- 15 En la realización de la presente invención en la que la célula es portadora de un gen OmpT mutado, el uno o varios sitios de restricción se pueden introducir mediante cualquier mutación adecuada que incluye una o varias mutaciones por delección, inserción, puntual, de sentido erróneo, sin sentido y de cambio de marco de lectura. Por ejemplo, en la realización en la que el gen OmpT comprende las mutaciones D210A y H212A, estas mutaciones introducen un sitio de restricción HindIII silencioso que se puede emplear como marcador de selección.
- 20 En el gen spr mutado y el gen DegP mutado, se puede introducir un sitio de restricción como marcador usando cambios de codones silenciosos. Por ejemplo, un sitio *Ase I* se puede usar como un sitio marcador de restricción silencioso, en donde el codón de detención TAA está fuera del marco de lectura, como se muestra en la Figura 9c para DegP.
- En las realizaciones de la presente invención, en las que el gen ptr está mutado para codificar una Proteasa III que tiene una actividad proteasa reducida, se pueden introducir uno o varios sitios de restricción marcadores usando cambios de codones silenciosos.
- 25 La célula bacteriana gram-negativa recombinante de acuerdo con la presente invención se puede producir a través de cualquier medio adecuado.
- El experto en la materia conoce técnicas adecuadas que se pueden emplear para reemplazar una secuencia génica cromosómica con una secuencia génica mutada para introducir el gen spr mutante. Se pueden emplear vectores adecuados que permiten la integración en el cromosoma del hospedador mediante recombinación homóloga.
- 30 Los métodos adecuados de reemplazo de genes se describen, por ejemplo, en Hamilton *et al.* (New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in *Escherichia coli*, Hamilton C. M. et al., Journal of Bacteriology Sept. 1989, Vol. 171, No. 9 p 4617-4622), Skorupski *et al.* (Positive selection vectors for allelic exchange, Skorupski K and Taylor R. K., Gene, 1996, 169, 47-52), Kiel *et al.* (A general method for the construction of *Escherichia coli* mutants by homologous recombination and plasmid segregation, Kiel J.A.K.W. et al., Mol Gen Genet 1987, 207:294-301), Blomfield *et al.* (Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature sensitive pSC101 replicon, Blomfield I. C. et al., Molecular Microbiology 1991, 5(6), 1447-1457) y Ried *et al.* (An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis, Ried J. L. and Collmer A., Gene 57 (1987) 239-246). Un plásmido adecuado que permite la recombinación/sustitución homóloga es el plásmido pKO3 (Link et al., 1997, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237).
- 35 En la realización en la que la célula comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC, la persona experta conoce técnicas adecuadas que se pueden usar para insertar el polinucleótido recombinante que codifica DsbC. El polinucleótido recombinante que codifica DsbC se puede integrar en el genoma de la célula usando un vector adecuado, tal como el plásmido pKO3.
- 40 En la realización en la que la célula comprende un polinucleótido recombinante que codifica una proteína de interés, la persona experta también conoce técnicas adecuadas que se pueden usar para insertar el polinucleótido recombinante que codifica la proteína de interés. El polinucleótido recombinante que codifica la proteína de interés se puede integrar en el genoma de la célula usando un vector adecuado, tal como el plásmido pKO3.
- 45 Alternativa o adicionalmente, el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y/o el polinucleótido recombinante que codifica una proteína de interés pueden no estar integrados en un casete de expresión recombinante. En una realización, se emplea un casete de expresión en la presente invención para transportar el polinucleótido que codifica la DsbC y/o la proteína de interés y una o varias secuencias de expresión reguladoras. La una o varias secuencias de expresión reguladoras pueden incluir un promotor. La una o varias secuencias de expresión reguladoras también pueden incluir una región 3' no traducida, tal como una secuencia de terminación. Los promotores adecuados se analizan con más detalle a continuación.
- 50 En una realización, se emplea un casete de expresión en la presente invención para transportar el polinucleótido que codifica la proteína de interés y/o el polinucleótido recombinante que codifica DsbC. Un casete de expresión normalmente comprende una o varias secuencias de expresión reguladoras, una o varias secuencias codificadoras
- 55

que codifican una o varias proteínas de interés y/o una secuencia codificadora que codifica DsbC. La una o varias secuencias de expresión reguladoras pueden incluir un promotor. La una o varias secuencias de expresión reguladoras también pueden incluir una región 3' no traducida, tal como una secuencia de terminación. Los promotores adecuados se analizan con más detalle a continuación.

- 5 En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención comprende uno o varios vectores, tales como un plásmido. El vector comprende preferiblemente uno o varios de los casetes de expresión como se han definido anteriormente. En una realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés y el polinucleótido que codifica DsbC, se insertan en un vector. Alternativamente, la secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés y el polinucleótido que codifica DsbC, se insertan en vectores distintos.
- 10 En la realización en la que la proteína de interés es un anticuerpo que comprende tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de la cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de la cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un solo vector, en donde el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de la cadena ligera y de la cadena pesada. Alternativamente, la secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo y el polinucleótido que codifica DsbC, se insertan en un vector. Preferiblemente, el vector comprende las secuencias que codifican los polipéptidos de la cadena ligera y pesada del anticuerpo.
- 15

En la realización en la que la célula también expresa una o varias proteínas adicionales como las siguientes:

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

- 25 la una o varias proteínas adicionales se pueden expresar a partir de uno o varios polinucleótidos insertados en el mismo vector que el polinucleótido que codifica DsbC y/o la secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés. Alternativamente, el uno o varios polinucleótidos se pueden insertar en vectores distintos.

- 30 El vector para uso en la presente invención se puede producir insertando uno o varios casetes de expresión como se han definido anteriormente en un vector adecuado. Alternativamente, las secuencias de expresión reguladoras para dirigir la expresión de la secuencia de polinucleótidos pueden estar contenidas en el vector y, por lo tanto, solo se puede requerir la región codificadora del polinucleótido para completar el vector.

El polinucleótido que codifica DsbC y/o el polinucleótido que codifica la proteína de interés se insertan adecuadamente en un vector replicable, normalmente un vector de replicación autónoma, para la expresión en la célula bajo el control de un promotor adecuado para la célula. Se conocen muchos vectores en la técnica para este fin y la selección del vector apropiado puede depender del tamaño del ácido nucleico y del tipo de célula particular.

- 35 Ejemplos de vectores que se pueden emplear para transformar la célula hospedadora con un polinucleótido de acuerdo con la invención incluyen:

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

- 40 Esos vectores generalmente comprenden un origen plasmídico de replicación de ADN, un marcador seleccionable con antibiótico, un promotor y un terminador transcripcional separado por un sitio de clonación múltiple (casete de expresión) y una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión a ribosomas.

- 45 Los promotores empleados en la presente invención se pueden unir al polinucleótido relevante de forma directa o alternativamente estar ubicados en una posición apropiada, por ejemplo, en un vector tal que cuando se inserta el polipéptido relevante, el promotor relevante puede actuar sobre el mismo. En una realización, el promotor está situado antes de la porción codificadora del polinucleótido sobre el que actúa, por ejemplo, un promotor relevante antes de cada porción codificadora del polinucleótido. "Antes", tal y como se usa en esta memoria, se entiende que implica que el promotor esté situado en el extremo 5 principal, en relación con la porción codificadora del polinucleótido.

- 50 Los promotores pueden estar de forma endógena o exógena en las células hospedadoras. Los promotores adecuados incluyen Lac, tac, trp, PhoA, lpp, Arab, Tet y T7.

Uno o varios promotores empleados pueden ser promotores inducibles.

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

10 Las unidades de expresión para uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada funcionalmente al ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor se puede retirar del ADN de origen bacteriano mediante digestión con enzimas de restricción e insertar en el vector que contiene el ADN deseado.

15 En las realizaciones de la presente invención en las que una secuencia de polinucleótidos comprende dos o más secuencias codificadoras de dos o más proteínas de interés, por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, la secuencia de polinucleótido puede comprender una o varias secuencias de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) que permiten el inicio de la traducción en el centro de un ARNm. Una secuencia IRES se puede situar entre secuencias de polinucleótidos codificadoras para mejorar la traducción separada del ARNm para producir las secuencias polipeptídicas codificadas.

20 El vector de expresión preferiblemente también comprende un mensaje dicistrónico para producir el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, tal y como se describe en los documentos WO 03/048208 o WO2007/039714 (cuyos contenidos se incorporan en esta memoria como referencia). Preferiblemente, el cistrón aguas arriba contiene ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo y el cistrón aguas abajo contiene ADN que codifica la cadena pesada correspondiente, y la secuencia intergénica dicistrónica (IGS) comprende preferiblemente una secuencia seleccionada a partir de IGS1 (SEQ ID NO: 36), IGS2 (SEQ ID NO: 37), IGS3 (SEQ ID NO: 38) e IGS4 (SEQ ID NO: 39).

25 Los terminadores pueden estar de forma endógena o exógena en las células hospedadoras. Un terminador adecuado es *rrmB*.

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

30 El polinucleótido de DsbC insertado en el vector de expresión comprende preferiblemente el ácido nucleico que codifica la secuencia señal de DsbC y la secuencia codificadora de DsbC. El vector contiene preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o varias células hospedadoras seleccionadas, preferiblemente que se replique independientemente del cromosoma del hospedador. Esas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias.

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

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

40 El polinucleótido que codifica la proteína de interés se puede expresar como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de un polipéptido natural o eucariota, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota. Las secuencias señal adecuadas incluyen *OmpA*, *PhoA*, *LamB*, *PeiB*, *DsbA* y *DsbC*.

45 En la construcción de vectores adecuados que contienen uno o varios de los componentes mencionados anteriormente, se emplean técnicas de ligación convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

50 En una realización preferida de la presente invención, la presente invención proporciona un vector multicistrónico que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica DsbC y la secuencia de polinucleótido que codifica una proteína de interés. El vector multicistrónico se puede producir mediante un método de clonación ventajoso que permite una clonación secuencial repetida de secuencias de polinucleótido en un vector. El método utiliza extremos cohesivos compatibles de una pareja de sitios de restricción, como los extremos "AT" de los sitios de restricción *Ase I* y *Nde I*. Una secuencia de polinucleótido que comprende una secuencia codificadora y que tiene extremos cohesivos compatibles, tal como un fragmento *AseI-NdeI*, se puede clonar en un sitio de restricción en el vector, tal como *Nde I*. La inserción de la secuencia de polinucleótido destruye el sitio de restricción 5' pero crea un nuevo sitio de restricción 3', tal como *NdeI*, el cual se puede emplear después para insertar una secuencia de polinucleótido

adicional que comprende extremos cohesivos compatibles. El procedimiento se puede repetir para insertar secuencias adicionales. Cada secuencia de polinucleótido insertada en el vector comprende una secuencia no codificadora en 3' del codón de detención que puede comprender un sitio *Ssp I* para el escrutinio, una secuencia que se une al ribosoma de Shine Dalgarno, un espaciador rico en A y un sitio *NdeI* que codifica un codón de inicio.

- 5 En la Figura 10 se muestra una representación esquemática de la creación de un vector que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo (LC), una cadena pesada de un anticuerpo (HC), una secuencia de polinucleótido de DsbC y otra secuencia de polinucleótido.

Las cepas mutadas con éxito se pueden identificar usando métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen la secuenciación de ADN con PCR en colonias y el cartografiado de enzimas de restricción con PCR en colonias.

- 10 En la realización en la que la célula comprende dos o más genes mutados, la proteasa mutada se puede introducir en la bacteria gram-negativa en el mismo vector o en vectores diferentes.

En una realización, la célula bacteriana gram-negativa de acuerdo con la presente invención no es portadora de un gen *ompT* mutado por inactivación, tal como si careciera de *ompT* cromosómico.

- 15 La célula de acuerdo con la presente invención puede comprender además una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína de interés. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de interés puede ser exógena o endógena. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de interés se puede integrar en el cromosoma del hospedador o puede no estar integrada en un vector, normalmente un plásmido.

- 20 En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención expresa una proteína de interés. "Proteína de interés" en el contexto de la presente memoria descriptiva se entiende que se refiere a un polipéptido para la expresión, generalmente un polipéptido recombinante. Sin embargo, la proteína de interés puede ser una proteína endógena expresada a partir de un gen endógeno en la célula hospedadora.

- 25 Tal y como se usa en esta memoria, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o produce usando tecnología de ADN recombinante. La proteína de interés puede ser una secuencia exógena, idéntica a la proteína endógena o una versión mutada de la misma, por ejemplo, con actividad biológica atenuada, o un fragmento de la misma, expresada a partir de un vector exógeno. Alternativamente, la proteína de interés puede ser una proteína heteróloga, normalmente no expresada por la célula hospedadora.

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

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

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

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

- 40 El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, que se encuentra en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de los órganos corporales, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y a propagarse (metástasis) a órganos distantes, por ejemplo: a los huesos, el hígado, los pulmones o el cerebro.

- 45 La proteína puede ser un polipéptido proteolíticamente sensible, es decir, proteínas que son propensas a escindir, susceptibles de escisión o que se escinden con una o varias bacterias gram-negativas, tales como *E. coli*, proteasas, ya sea en el estado natural o durante la secreción. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a una proteasa seleccionada a partir de DegP, Proteasa III y Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a la proteasa Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP y Proteasa III. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP y Tsp. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas Tsp y Proteasa III. En una realización, la proteína de interés es proteolíticamente sensible a las proteasas DegP, Proteasa III y Tsp.

Preferiblemente, la proteína es un polipéptido eucariota.

La proteína de interés expresada por las células de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, un

- inmunógeno, una proteína de fusión que comprende dos proteínas heterólogas o un anticuerpo. Los anticuerpos para uso como proteína de interés incluyen anticuerpos monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados, completamente humanos o quiméricos. El anticuerpo puede proceder de cualquier especie, pero se obtiene preferiblemente a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano o un fragmento humanizado. El anticuerpo se puede obtener a partir de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina y se puede obtener a partir de cualquier especie, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Se pueden obtener partes del fragmento de anticuerpo a partir de más de una especie, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra.
- El anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas, p. ej., VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmento scFv, Fab-Fv o un anticuerpo de doble especificidad, tal como un Fab-dAb, como se describe en el documento PCT/GB2008/003331.
- El anticuerpo puede ser específico de cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a una célula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tal como las proteínas reguladas al alza durante una enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de proteínas de la superficie celular, incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como las integrinas β 1, p. ej., VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CD28, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD44, CD45, CD47, CD54, CD56, CD57, CD59, CD63, CD64, CD66, CD68, CD69, CD70, CD71, CD73, CD74, CD77, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD93, CD94, CD95, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD108, CD109, CD110, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD121, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD128, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158, CD159, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172, CD173, CD174, CD175, CD176, CD177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, CD201, CD202, CD203, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CD211, CD212, CD213, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CD293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD341, CD342, CD343, CD344, CD345, CD346, CD347, CD348, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD356, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, CD371, CD372, CD373, CD374, CD375, CD376, CD377, CD378, CD379, CD380, CD381, CD382, CD383, CD384, CD385, CD386, CD387, CD388, CD389, CD390, CD391, CD392, CD393, CD394, CD395, CD396, CD397, CD398, CD399, CD400, CD401, CD402, CD403, CD404, CD405, CD406, CD407, CD408, CD409, CD410, CD411, CD412, CD413, CD414, CD415, CD416, CD417, CD418, CD419, CD420, CD421, CD422, CD423, CD424, CD425, CD426, CD427, CD428, CD429, CD430, CD431, CD432, CD433, CD434, CD435, CD436, CD437, CD438, CD439, CD440, CD441, CD442, CD443, CD444, CD445, CD446, CD447, CD448, CD449, CD450, CD451, CD452, CD453, CD454, CD455, CD456, CD457, CD458, CD459, CD460, CD461, CD462, CD463, CD464, CD465, CD466, CD467, CD468, CD469, CD470, CD471, CD472, CD473, CD474, CD475, CD476, CD477, CD478, CD479, CD480, CD481, CD482, CD483, CD484, CD485, CD486, CD487, CD488, CD489, CD490, CD491, CD492, CD493, CD494, CD495, CD496, CD497, CD498, CD499, CD500, CD501, CD502, CD503, CD504, CD505, CD506, CD507, CD508, CD509, CD510, CD511, CD512, CD513, CD514, CD515, CD516, CD517, CD518, CD519, CD520, CD521, CD522, CD523, CD524, CD525, CD526, CD527, CD528, CD529, CD530, CD531, CD532, CD533, CD534, CD535, CD536, CD537, CD538, CD539, CD540, CD541, CD542, CD543, CD544, CD545, CD546, CD547, CD548, CD549, CD550, CD551, CD552, CD553, CD554, CD555, CD556, CD557, CD558, CD559, CD560, CD561, CD562, CD563, CD564, CD565, CD566, CD567, CD568, CD569, CD570, CD571, CD572, CD573, CD574, CD575, CD576, CD577, CD578, CD579, CD580, CD581, CD582, CD583, CD584, CD585, CD586, CD587, CD588, CD589, CD590, CD591, CD592, CD593, CD594, CD595, CD596, CD597, CD598, CD599, CD600, CD601, CD602, CD603, CD604, CD605, CD606, CD607, CD608, CD609, CD610, CD611, CD612, CD613, CD614, CD615, CD616, CD617, CD618, CD619, CD620, CD621, CD622, CD623, CD624, CD625, CD626, CD627, CD628, CD629, CD630, CD631, CD632, CD633, CD634, CD635, CD636, CD637, CD638, CD639, CD640, CD641, CD642, CD643, CD644, CD645, CD646, CD647, CD648, CD649, CD650, CD651, CD652, CD653, CD654, CD655, CD656, CD657, CD658, CD659, CD660, CD661, CD662, CD663, CD664, CD665, CD666, CD667, CD668, CD669, CD670, CD671, CD672, CD673, CD674, CD675, CD676, CD677, CD678, CD679, CD680, CD681, CD682, CD683, CD684, CD685, CD686, CD687, CD688, CD689, CD690, CD691, CD692, CD693, CD694, CD695, CD696, CD697, CD698, CD699, CD700, CD701, CD702, CD703, CD704, CD705, CD706, CD707, CD708, CD709, CD710, CD711, CD712, CD713, CD714, CD715, CD716, CD717, CD718, CD719, CD720, CD721, CD722, CD723, CD724, CD725, CD726, CD727, CD728, CD729, CD730, CD731, CD732, CD733, CD734, CD735, CD736, CD737, CD738, CD739, CD740, CD741, CD742, CD743, CD744, CD745, CD746, CD747, CD748, CD749, CD750, CD751, CD752, CD753, CD754, CD755, CD756, CD757, CD758, CD759, CD760, CD761, CD762, CD763, CD764, CD765, CD766, CD767, CD768, CD769, CD770, CD771, CD772, CD773, CD774, CD775, CD776, CD777, CD778, CD779, CD780, CD781, CD782, CD783, CD784, CD785, CD786, CD787, CD788, CD789, CD790, CD791, CD792, CD793, CD794, CD795, CD796, CD797, CD798, CD799, CD800, CD801, CD802, CD803, CD804, CD805, CD806, CD807, CD808, CD809, CD810, CD811, CD812, CD813, CD814, CD815, CD816, CD817, CD818, CD819, CD820, CD821, CD822, CD823, CD824, CD825, CD826, CD827, CD828, CD829, CD830, CD831, CD832, CD833, CD834, CD835, CD836, CD837, CD838, CD839, CD840, CD841, CD842, CD843, CD844, CD845, CD846, CD847, CD848, CD849, CD850, CD851, CD852, CD853, CD854, CD855, CD856, CD857, CD858, CD859, CD860, CD861, CD862, CD863, CD864, CD865, CD866, CD867, CD868, CD869, CD870, CD871, CD872, CD873, CD874, CD875, CD876, CD877, CD878, CD879, CD880, CD881, CD882, CD883, CD884, CD885, CD886, CD887, CD888, CD889, CD890, CD891, CD892, CD893, CD894, CD895, CD896, CD897, CD898, CD899, CD900, CD901, CD902, CD903, CD904, CD905, CD906, CD907, CD908, CD909, CD910, CD911, CD912, CD913, CD914, CD915, CD916, CD917, CD918, CD919, CD920, CD921, CD922, CD923, CD924, CD925, CD926, CD927, CD928, CD929, CD930, CD931, CD932, CD933, CD934, CD935, CD936, CD937, CD938, CD939, CD940, CD941, CD942, CD943, CD944, CD945, CD946, CD947, CD948, CD949, CD950, CD951, CD952, CD953, CD954, CD955, CD956, CD957, CD958, CD959, CD960, CD961, CD962, CD963, CD964, CD965, CD966, CD967, CD968, CD969, CD970, CD971, CD972, CD973, CD974, CD975, CD976, CD977, CD978, CD979, CD980, CD981, CD982, CD983, CD984, CD985, CD986, CD987, CD988, CD989, CD990, CD991, CD992, CD993, CD994, CD995, CD996, CD997, CD998, CD999.
- Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tal como IL17A y/o IL17F, antígenos víricos, por ejemplo, virus respiratorio sincitial o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (anteriormente conocido como factor de necrosis tumoral α), factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias como G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, en su caso, receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos bacterianos de la superficie celular, toxinas bacterianas, virus como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionucleidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.
- En una realización, el anticuerpo se puede usar para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.
- En un aspecto de la presente invención, se proporciona una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende un gen spr mutante que codifica una proteína spr mutante, un gen Tsp de tipo silvestre y una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno específico de TNF. El gen Tsp cromosómico de tipo silvestre es preferiblemente un gen Tsp cromosómico no recombinante. Preferiblemente, la célula comprende además un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.
- En una realización preferida, la proteína de interés expresada por las células de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-TNF, más preferiblemente un Fab' anti-TNF, como se describe en el documento WO01/094585 (cuyo contenido se incorpora en esta memoria como referencia).
- En una realización, el anticuerpo que tiene especificidad para TNF α humano, comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28 para CDRH1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 34 para CDRH2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 para CDRH3.
- En una realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31 para CDRL1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 para CDRL2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 33 para CDRL3.
- Las CDRs proporcionadas en SEQ IDs NOs: 28 y 30 a 34 mencionadas anteriormente, se obtienen a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40. Sin embargo, SEQ ID NO: 29 consiste en una CDR híbrida. La CDR híbrida comprende parte de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40 (SEQ ID NO: 34) y parte de la CDR2 de la cadena pesada de una secuencia de la región V de la línea germinal del grupo humano 3.
- En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28 para CDRH1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ

ID NO: 34 para CDRH2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 para CDRH3 y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31 para CDRL1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 para CDRL2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 33 para CDRL3.

- 5 En una realización, el anticuerpo comprende SEQ ID NO: 28 para CDRH1, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 34 para CDRH2, SEQ ID NO: 30 para CDRH3, SEQ ID NO: 31 para CDRL1, SEQ ID NO: 32 para CDRL2 y SEQ ID NO: 33 para CDRL3. Preferiblemente, el anticuerpo comprende SEQ ID NO: 29 para CDRH2.

El anticuerpo anti-TNF es preferiblemente una molécula de anticuerpo injertada con CDRs. En una realización preferida, el dominio variable comprende regiones estructurales del receptor humano y CDRs del donante no humano.

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

El anticuerpo anti-TNF es preferiblemente un fragmento Fab o Fab'.

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

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

- 20 La expresión molécula efectora tal y como se usa en esta memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas, por ejemplo, ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopía de RMN o ESR. Un efector molecular se puede fijar al anticuerpo o a un fragmento del mismo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo se puede modificar para que se fije al menos a una molécula efectora, tal y como se describe en los documentos WO05/003171 o WO05/003170 (cuyo contenido se incorpora en esta memoria como referencia). Los documentos WO05/003171 o WO05/003170 describen también moléculas efectoras adecuadas.

- 30 En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo, tal como un Fab, se PEGila para generar un producto con las propiedades requeridas, por ejemplo, similar a los anticuerpos completos, si es necesario. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un Fab' anti-TNF- α PEGilado, como se describe en el documento WO01/094585, preferiblemente fijando a uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo obtenido a partir de lisil-maleimida, en donde a cada uno de los dos grupos amino del residuo de lisilo se le ha unido covalentemente un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da, de modo que el peso molecular promedio total de los residuos de metoxipoli(etilenglicol) es de aproximadamente 40.000 Da, más preferiblemente el grupo obtenido a partir de lisil-maleimida es [1-[[[2-[[3-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxopropil]amino]etil]amino]-carbonil]-1,5-pentanodil]bis(iminocarbonilo).

- 40 La célula también puede comprender secuencias de polinucleótidos adicionales que codifican una o varias proteínas de interés adicionales.

- 45 En una realización, una o varias proteínas hospedadoras de *E. coli* que en el tipo silvestre se sabe que se purifican conjuntamente con la proteína recombinante de interés durante la purificación, se seleccionan para una modificación genética, tal y como se describe en Humphreys et al. "Engineering of *Escherichia coli* to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein", Protein Expression and Purification 37 (2004) 109-118 y el documento WO04/035792 (cuyo contenido se incorpora en esta memoria como referencia). El uso de tales proteínas hospedadoras modificadas mejora el procedimiento de purificación de las proteínas de interés, especialmente anticuerpos, producidos en *E. coli* alterando las propiedades físicas de las proteínas seleccionadas de *E. coli*, de modo que ya no se purifican conjuntamente con el anticuerpo recombinante. Preferiblemente la proteína de *E. coli* que se altera, se selecciona a partir de una o varias proteínas que se unen a fosfato (PhoS/PstS), proteína que se une a dipéptido (DppA), proteína que se une a maltosa (MBP) y tiorredoxina.

- 50 En una realización, una propiedad física de una proteína hospedadora contaminante se altera mediante la adición de un marcador de aminoácidos al extremo C-terminal o N-terminal. En una realización preferida, la propiedad física que se altera es el punto isoeléctrico y el marcador de aminoácidos es un marcador de poli(ácido aspártico) fijado al extremo C-terminal. En una realización, las proteínas de *E. coli* alteradas por la adición de dicho marcador son la proteína que se une a fosfato (PhoS/PstS), la proteína que se une a maltosa (MBP), la tiorredoxina y la proteína que se une a fosfato de *E. coli* (PhoS/PstS). En una realización específica, el pI de la proteína que se une a fosfato de *E. coli* (PhoS/PstS) se reduce de 7,2 a 5,1 mediante la adición de un marcador de poli(ácido aspártico) (polyD), que

contiene 6 residuos de ácido aspártico en el extremo C-terminal.

También se prefiere la modificación de residuos específicos de la proteína contaminante de *E. coli* para alterar sus propiedades físicas, ya sea sola o en combinación con la adición de marcadores en los extremos terminales N o C. Tales cambios pueden incluir inserciones o deleciones para alterar el tamaño de la proteína o sustituciones de aminoácidos para alterar el pI o la hidrofobicidad. En una realización, esos residuos se encuentran en la superficie de la proteína. En una realización preferida, los residuos superficiales de la proteína PhoS se alteran para reducir el pI de la proteína. Preferiblemente, los residuos que han sido implicados por ser importantes en la unión de fosfato (Bass, documento US5.304.472) se evitan para mantener una proteína PhoS funcional. Preferiblemente, se dirige hacia residuos de lisina que se proyectan lejos de la superficie de la proteína o que están en grupos grandes, o cerca de los mismos, de residuos básicos. En una realización, la proteína PhoS tiene un marcador de hexa poli(ácido aspártico) fijado al extremo C-terminal, mientras que los residuos de la superficie en el extremo opuesto de la molécula son una diana para una sustitución. Preferiblemente, los residuos de lisina seleccionados se sustituyen por ácido glutámico o ácido aspártico para conferir un mayor cambio potencial del pI que cuando se cambian residuos neutros por ácidos. La designación de un mutante por sustitución en esta memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra indica el aminoácido en la proteína de tipo silvestre. El número se refiere a la posición del aminoácido en el que se está realizando la sustitución de aminoácido, y la segunda letra indica el aminoácido que se usa para reemplazar al aminoácido de tipo silvestre. En mutaciones preferidas de PhoS en la presente invención, los residuos de lisina (K) 275, 107, 109, 110, 262, 265, 266, 309, 313 se sustituyen por ácido glutámico (E) o glutamina (Q), como mutaciones individuales o combinadas, además, la lisina (K)318 se puede sustituir por ácido aspártico (D) como una mutación individual o combinada. Preferiblemente, las mutaciones individuales son K262E, K265E y K266E. Preferiblemente, las mutaciones combinadas son K265/266E y K110/265/266E. Más preferiblemente, todas las mutaciones se combinan con el marcador de poli(ácido aspártico) (polyD) fijado al extremo C-terminal y opcionalmente también con la sustitución K318D. En una realización preferida, las mutaciones dan como resultado una reducción en el pI de al menos 2 unidades. Preferiblemente, las mutaciones de la presente invención reducen el pI de PhoS desde 7,2 a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5. En una realización de la presente invención, el pI de la proteína PhoS de *E. coli* se reduce desde 7,2 a aproximadamente 4,9, aproximadamente 4,8 y aproximadamente 4,5 usando las mutaciones polyD K318D, polyD K265/266E y polyD K110/265/266E respectivamente.

El polinucleótido que codifica la proteína de interés se puede expresar como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido natural o eucariota, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta. Las secuencias señal adecuadas incluyen OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA y DsbC.

Las realizaciones de la invención descritas en esta memoria que hacen referencia al polinucleótido, se aplican igualmente a realizaciones alternativas de la invención, por ejemplo, vectores, casetes de expresión y/o células hospedadoras que comprenden los componentes empleados en las mismas, en la medida en que el aspecto relevante se pueda aplicar a las mismas.

La presente invención también proporciona un método para producir una proteína recombinante de interés que comprende cultivar una célula bacteriana gram-negativa recombinante como se ha descrito anteriormente, en un medio de cultivo en condiciones eficaces para expresar la proteína recombinante de interés y recuperar la proteína recombinante de interés a partir del periplasma de la célula bacteriana gram-negativa recombinante y/o del medio de cultivo. En una realización en la que la célula comprende un polinucleótido recombinante que codifica DsbC, la célula se cultiva en condiciones eficaces para expresar el polinucleótido recombinante que codifica DsbC.

La célula bacteriana gram-negativa y la proteína de interés empleadas preferiblemente en el método de la presente invención, se han descrito con detalle anteriormente.

Cuando el polinucleótido que codifica la proteína de interés es exógeno, el polinucleótido se puede incorporar a la célula hospedadora usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. La secuencia de polinucleótido que codifica DsbC también se puede incorporar a la célula hospedadora usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Normalmente, el polinucleótido se incorpora como parte de un vector de expresión que se transforma en la célula. Por consiguiente, en un aspecto, la célula de acuerdo con la presente invención comprende un casete de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de interés y un casete de expresión que comprende el polinucleótido que codifica DsbC.

La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de interés y la secuencia de polinucleótido que codifica DsbC se pueden transformar en una célula utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, empleando cloruro de rubidio, PEG o electroporación.

El método de acuerdo con la presente invención también puede emplear un sistema de selección para facilitar la selección de células estables que se han transformado con éxito con el polinucleótido que codifica la proteína de interés. El sistema de selección normalmente emplea una cotransformación de una secuencia de polinucleótido que

codifica un marcador de selección. En una realización, cada polinucleótido transformado en la célula comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica uno o varios marcadores de selección. En consecuencia, la transformación del polinucleótido que codifica la proteína de interés y, opcionalmente, el polinucleótido que codifica DsbC y el uno o varios polinucleótidos que codifican el marcador, sucede a la vez y el sistema de selección se puede emplear para seleccionar aquellas células que producen las proteínas deseadas.

Las células capaces de expresar uno o varios marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo ciertas condiciones impuestas artificialmente, por ejemplo, la adición de una toxina o un antibiótico, ya que las propiedades provistas por el polipéptido/gen o componente polipeptídico del sistema de selección se incorporan en el mismo (por ejemplo, resistencia a antibióticos). Las células que no pueden expresar uno o varios marcadores, no son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas artificialmente. Las condiciones impuestas artificialmente se pueden elegir para que sean más o menos enérgicas, según se requiera.

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

En la presente invención se puede usar un sistema de expresión inducible o un promotor constitutivo para expresar la proteína de interés y/o la DsbC. En una realización, la expresión de la secuencia de polinucleótido que codifica una proteína de interés y el polinucleótido recombinante que codifica DsbC, se induce añadiendo un inductor al medio de cultivo. Los sistemas de expresión inducibles adecuados y los promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica.

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

Las células obtenidas a partir del medio se pueden someter a un escrutinio y/o purificación adicional según se requiera. El método puede comprender además una o varias etapas para extraer y purificar la proteína de interés según se requiera.

El polipéptido se puede recuperar a partir de la cepa, incluso a partir del citoplasma, el periplasma y/o el material sobrenadante.

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

En una realización, el método comprende además separar la proteína recombinante de interés procedente de DsbC.

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

El método también puede incluir una etapa adicional para medir la cantidad de expresión de la proteína de interés y seleccionar células que tengan niveles elevados de expresión de la proteína de interés.

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

Una o varias etapas del método descrito en esta memoria, se pueden realizar en combinación en un recipiente adecuado, tal como un biorreactor.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de la cepa celular MXE001 (Δ Tsp)

La cepa MXE001 se generó de la siguiente manera:

El casete de Tsp se transfirió como fragmentos de restricción Sal I, Not I dentro de plásmidos pKO3 restringidos de manera similar. El plásmido pKO3 utiliza el mutante sensible a la temperatura del origen de replicación de pSC101 (*RepA*) junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar eventos de integración cromosómica. El gen

sacB que codifica la levansucrasa, es letal para *E. coli* que crece sobre sacarosa y, por lo tanto, (junto con el marcador de cloranfenicol y el origen de pSC101) se usa para forzar y seleccionar eventos de desintegración y curado de plásmidos. Esta metodología había sido descrita previamente (Hamilton et al., 1989, Journal of Bacteriology, 171, 4617-4622 y Blomfield et al., 1991, Molecular Microbiology, 5, 1447-1457). El sistema de pKO3 elimina todos los marcadores selectivos del genoma del hospedador, excepto el gen insertado.

Se construyeron los siguientes plásmidos.

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

El plásmido se transformó después en células W3110 electrocompetentes competentes de *E. coli*, preparadas usando el método encontrado en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "Escherichia coli electrotransformation," in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 105 (1995).

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

Día 2 El número de colonias que crecían a 30°C proporcionó una estimación de la eficiencia de la electroporación, mientras que las colonias que sobrevivían el crecimiento a 43°C representan posibles eventos de integración. Se recogieron colonias individuales de la placa a 43°C y se resuspendieron en 10 ml de 2xPY. Se extendieron 100 µl de esto sobre placas de agar 2xPY que contenían sacarosa al 5% (p/v), precalentadas a 30°C para generar colonias individuales. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

Día 3 Las colonias en ese caso representan eventos potenciales simultáneos de desintegración y curado de plásmidos. Si los eventos de desintegración y curado tenían lugar pronto en el crecimiento, entonces la mayor parte de la masa de la colonia sería clonal. Se recogieron colonias individuales y se sometieron a la técnica "replica plating" (un método de transferencia de colonias) sobre placas con agar 2xPY que contenían cloranfenicol a 20 µg/ml o sacarosa al 5% (p/v). Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

Día 4 Las colonias que crecían sobre sacarosa y morían sobre cloranfenicol representan eventos potenciales de reemplazo cromosómico y de curado de plásmidos. Estas se recogieron y se escrutaron mediante PCR con un oligonucleótido específico de una mutación. Las colonias que generaban una banda positiva en la PCR con el tamaño correcto, se aislaron para producir colonias individuales en agar 2xPY que contenía sacarosa al 5% (p/v) y las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

Día 5 Colonias individuales de *E. coli* positivas para la PCR, sensibles al cloranfenicol y resistentes a la sacarosa, se usaron para preparar reservas en glicerol de células químicamente competentes y actuaron como moldes de PCR para una reacción PCR con oligos flanqueantes en 5' y 3' para generar un producto de la PCR para la secuenciación directa de ADN utilizando Taq polimerasa.

La cepa de células MXE001 se sometió a ensayo para confirmar la modificación exitosa del ADN genómico que era portador del gen Tsp mutado, mediante una amplificación con PCR de la región del gen Tsp que comprendía un sitio de restricción Ase I de origen no natural, como se muestra en las Figuras 1a, 1b y 1c, usando cebadores de oligonucleótidos. Las regiones amplificadas del ADN se analizaron después mediante electroforesis en gel, antes y después de una incubación con la enzima de restricción Ase I para confirmar la presencia del sitio de restricción Ase I de origen no natural en los genes mutados. Este método se realizó de la siguiente manera:

Los siguientes oligos se usaron para amplificar, usando PCR, el ADN genómico procedente de lisados celulares de *E. coli* de MXE001 y W3110:

6284 Tsp 3' 5'-GCATCATAATTTTCTTTTACCTC-3 '(SEQ ID NO: 15)

6283 Tsp 5' 5'-GGGAAATGAACCTGAGCAAACGC-3 '(SEQ ID NO: 16)

Los lisados se prepararon calentando una sola colonia de células durante 10 minutos a 95°C en 20 µl de 1x tampón de PCR. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 13.200 rpm durante 10 minutos. El material sobrenadante se retiró y se marcó como "lisado celular".

Cada cepa se amplificó utilizando la pareja de oligos de Tsp.

ES 2 747 981 T3

El ADN se amplificó usando un procedimiento de PCR convencional.

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

Ciclo de PCR.

94°C	1 minuto
94°C	1 minuto
55°C	1 minuto repetido durante 30 ciclos
72°C	1 minuto
72°C	10 minutos

5 Una vez que se completaron las reacciones, se retiraron 25 µl a un nuevo tubo de microcentrífuga para su digestión con Ase I. A los 25 µl de la reacción PCR se añadieron 19 µl de H₂O, 5 µl de tampón 3 (NEB), 1 µl de Ase I (NEB), se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 2 horas.

A la reacción de PCR restante se añadieron 5 µl de tampón de carga (x6) y se cargaron 20 µl en un gel de agarosa de 200 ml con 0,8% de TAE (Invitrogen) más bromuro de etidio (5 µl de una reserva de 10 mg/ml) y se ejecutó a 100 voltios durante 1 hora. Se cargaron 10 µl de marcador de tamaño (marcador de ADN Perfect 0,1-12 Kb, Novagen) en el carril final.

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

15 El fragmento genómico amplificado mostraba la banda del tamaño correcto de 2,8 Kb para Tsp. Después de la digestión con Ase I, esto confirmó la presencia de los sitios Ase I introducidos en la cepa carente de Tsp, MXE001, pero no en el control, W3110.

MXE001: El ADN genómico amplificado usando el conjunto de cebadores de Tsp y el ADN resultante se digirieron con Ase I para producir bandas de 2,2 y 0,6 Kpbs.

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

20 Ejemplo 2 - Generación de mutantes de spr

Las mutaciones de spr se generaron y seleccionaron para usar en un ensayo de complementación.

25 El gen spr se mutó usando el kit de PCR de diversidad de mutagénesis aleatoria Clontech® que introducía 1 a 2 mutaciones por cada 1000 pb. El ADN de la PCR con spr mutado se clonó en un vector de expresión inducible [pTTO CDP870] que expresaba Fab' de CDP870 junto con el mutante de spr. Esta ligación se electro-transformó posteriormente en una cepa de *E. coli* MXE001 (Δ Tsp) preparada utilizando el método que se encuentra en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "Escherichia coli electrotransformation", en *Methods in Molecular Biology*, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 105 (1995). Se usó el siguiente protocolo, se añadieron 40 µl de MXE001 electrocompetente, 2,5 µl de la ligación (100 pg de ADN) a una cubeta de electroporación de 0,2 cm, se realizó la electrotransformación utilizando BioRad Genepulser Xcell con las siguientes condiciones, 2500 V, 25 µF y 200 Ω.

30 Después de la electrotransformación, se añadió 1 ml de SOC (Invitrogen) (precalentado a 37°C) y se permitió que las células se recuperaran a 37°C durante 1 hora con agitación suave.

Las células se extendieron en placas sobre agar hipotónico (5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona, 15 g/L de agar (todos de Difco)) y se incubaron a 40°C. Las células que formaban colonias se volvieron a extender en placas sobre HLB a 43°C para confirmar la restauración de la capacidad de crecimiento en condiciones osmóticas bajas a temperatura elevada en la cepa MXE001. El ADN plasmídico se preparó a partir de los clones seleccionados y se secuenció para identificar mutaciones de spr.

5 Usando este método, se aislaron ocho mutaciones simples, una doble y dos mutaciones múltiples en la proteína spr que complementaban el fenotipo ΔTsp de la siguiente manera:

1. V98E
2. D133A
- 10 3. V135D
4. V135G
5. G147C
6. S95F y Y115F
7. I70T
- 15 8. N31T, Q73R, R100G, G140C
9. R62C, Q99P, R144C
10. L108S
11. L136P

Ejemplo 3 - Generación de cepas mutantes de células *E. coli* que son portadoras de mutaciones de spr

20 Las mutaciones individuales 1 a 5 identificadas en el Ejemplo 2 y tres mutaciones de la tríada catalítica de spr (C94A, H145A, H157A) y W174R, se usaron para generar nuevas cepas usando la cepa de *E. coli* W3110 de tipo silvestre (genotipo: F-LAM- IN (rrnD-rrnE)1 rph1 (ATCC n° 27325)) para crear cepas mutadas en spr que eran portadoras de un gen Tsp cromosómico no recombinante de tipo silvestre o una cepa MXE001 (ΔTsp) del Ejemplo 1, para preparar cepas combinadas de $\Delta Tsp/spr$ mutante.

25 Las siguientes cepas de células de *E. coli* mutantes se generaron usando un sistema de vector de reemplazo génico usando el plásmido de recombinación/reemplazo homólogo pKO3 (Link et al., 1997, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237), como se describe en el Ejemplo 1 para la generación de MXE001.

Tabla 1

Cepa de células <i>E. coli</i> mutantes	Genotipo	Vectores de Spr
MXE001	ΔTsp	-
MXE008	ΔTsp , spr D133A	pMXE339, pK03 spr D133A (-Sall)
MXE009	ΔTsp , spr H157A	pMXE345, pK03 spr H157A (-Sall)
MXE010	spr G147C	pMXE338, pK03 spr G147C (-Sall)
MXE011	spr C94A	pMXE343, pK03 spr C94A (-Sall)
MXE012	spr H145A	pMXE344, pK03 spr H145A (-Sall)
MXE013	spr W174R	pMXE346, pK03 spr W174R (-Sall)
MXE014	ΔTsp , spr V135D	pMXE340, pK03 spr V135D (-Sall)
MXE015	ΔTsp , spr V98E	pMXE342, pK03 spr V98E (-Sall)
MXE016	ΔTsp , spr C94A	pMXE343, pK03 spr C94A (-Sall)
MXE017	ΔTsp , spr H145A	pMXE344, pK03 spr H145A (-Sall)
MXE018	ΔTsp , spr V135G	pMXE341, pK03 spr V135G (-Sall)

Los casetes de integración de spr mutante se transferían como fragmentos de restricción Sal I, Not I en plásmidos pKO3 restringidos de manera similar.

El plásmido utiliza el mutante sensible a la temperatura del origen de replicación de pSC101 (*RepA*) junto con un marcador de cloranfenicol para forzar y seleccionar eventos de integración cromosómica. El gen *sacB* que codifica una levansucrasa es letal para *E. coli* que crece sobre sacarosa y, por lo tanto, (junto con el marcador de cloranfenicol y el origen de pSC101) se usa para forzar y seleccionar eventos de desintegración y curado de plásmidos. Esta metodología había sido descrita previamente (Hamilton et al., 1989, Journal of Bacteriology, 171, 4617-4622 y Blomfield et al., 1991, Molecular Microbiology, 5, 1447-1457). El sistema de pKO3 elimina todos los marcadores selectivos del genoma del hospedador, excepto el gen insertado.

10 Se construyeron los siguientes vectores de pKO3, que comprendían los genes spr mutados que incluían una mutación silenciosa dentro de la secuencia de spr que elimina un sitio de restricción Sall para la identificación del clon.

pMXE336, pKO3 spr S95F (-Sall)

pMXE337, pKO3 spr Y115F (-Sall)

15 pMXE338, pKO3 spr G147C (-Sall)

pMXE339, pKO3 spr D133A (-Sall)

pMXE340, pKO3 spr V135D (-Sall)

pMXE341, pKO3 spr V135G (-Sall)

pMXE342, pKO3 spr V98E (-Sall)

20 pMXE343, pKO3 spr C94A (-Sall)

pMXE344, pKO3 spr H145A (-Sall)

pMXE345, pKO3 spr H157A (-Sall)

pMXE346, pKO3 spr W174R (-Sall)

25 Estos plásmidos se transformaron después en células W3110 de *E. coli* químicamente competentes, preparadas usando el método que se encuentra en Miller, E.M. y Nickoloff, J.A., "Escherichia coli electrotransformation", in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 105 (1995), o en la cepa MXE001 del Ejemplo 1 para preparar cepas combinadas de Δ Tsp/mutante de spr, como se muestran en la Tabla 1.

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

35 **Día 2** El número de colonias que crecían a 30°C proporcionó una estimación de la eficiencia de la electroporación, mientras que las colonias que sobrevivían el crecimiento a 43°C representan eventos potenciales de integración. Se recogieron colonias individuales de la placa a 43°C y se resuspendieron en 10 ml de 2xPY. Se extendieron 100 μ l de esto sobre placas de agar 2xPY que contenían sacarosa al 5% (p/v), precalentadas a 30°C para generar colonias individuales. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

40 **Día 3** Las colonias en este caso representan eventos potenciales simultáneos de desintegración y curado de plásmidos. Si los eventos de desintegración y curado tenían lugar pronto en el crecimiento, entonces la mayor parte de la masa de la colonia sería clonal. Se recogieron colonias individuales y se sometieron a "replica plating" sobre placas con agar 2xPY que contenían cloranfenicol a 20 μ g/ml o sacarosa al 5% (p/v). Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

45 **Día 4** Las colonias que crecían sobre sacarosa y morían sobre cloranfenicol representan eventos potenciales de reemplazo cromosómico y de curado de plásmidos. Estas se recogieron y se escrutaron mediante PCR más una digestión de restricción para estudiar la pérdida de un sitio Sall. Las colonias que generaban una banda positiva en la PCR con el tamaño correcto y resistencia a la digestión con Sall, se aislaron para producir colonias individuales en agar 2xPY que contenía sacarosa al 5% (p/v) y las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

50 **Día 5** Colonias individuales de *E. coli* positivas para la PCR, sensibles al cloranfenicol y resistentes a la

sacarosa, se usaron para preparar reservas en glicerol de células químicamente competentes y actuaron como moldes de PCR para una reacción PCR con oligos flanqueantes en 5' y 3' para generar un producto de la PCR para la secuenciación directa del ADN utilizando Taq polimerasa, para confirmar la mutación correcta.

Ejemplo 4 - Generación de plásmidos para la coexpresión de Fab' y DsbC

5 Se construyó un plásmido que contenía las secuencias de la cadena pesada y ligera de un Fab' anti-TNF (un Fab' anti-TNF que tenía una secuencia de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 13 y una secuencia de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 14) y la secuencia que codificaba DsbC.

10 Se creó un mensaje dicistrónico del fragmento Fab' anti-TNFa (denominado CDP870) descrito en el documento WO01/94585. El cistrón aguas arriba codificaba la cadena ligera del anticuerpo (SEQ ID NO: 13) mientras que el cistrón aguas abajo codificaba la cadena pesada del anticuerpo (SEQ ID NO: 14). Una secuencia de ADN que codificaba el péptido señal de OmpA, se fusionó con el extremo 5' del ADN que codificaba cada cadena ligera y cadena pesada para permitir una secreción eficaz al periplasma. La secuencia intergénica (IGS2) se usó como se muestra en SEQ ID NO: 37.

15 El plásmido pDPH358 (pTTO 40.4 CDP870 IGS2), un vector de expresión para el Fab' CDP870 (un Fab' anti-TNF) y DsbC (un polipéptido periplásmico), se construyó utilizando metodologías convencionales de clonación por restricción que se pueden encontrar en Sambrook et al. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press, N.Y. El plásmido pDPH358 contenía las siguientes características; un promotor *tac* fuerte y una secuencia de operador *lac*. Como se muestra en la Figura 10, el plásmido contenía un sitio de restricción EcoRI único después de la región codificadora de la cadena pesada de Fab', seguido de una secuencia no codificadora y luego un sitio de restricción NdeI único. El gen DsbC se clonó con PCR usando ADN cromosómico bruto de W3110 como molde, de modo que el producto de la PCR codificaba un sitio EcoRI 5' seguido de una unión fuerte al ribosoma, seguido por el codón de inicio natural, la secuencia señal y la secuencia madura de DsbC, que terminaba en un marcador His C-terminal y finalmente un sitio NdeI no codificante. El fragmento de la PCR EcoRI-NdeI se restringió y se ligó en el vector de expresión de manera que los tres polipéptidos: cadena ligera de Fab', cadena pesada de Fab' y DsbC se codificaron en un solo ARNm policistrónico.

20 Los genes de la cadena ligera de Fab, los genes de la cadena pesada de Fab y el gen DsbC se transcribieron como un solo mensaje policistrónico. El ADN que codificaba el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli*, se fusionó con el extremo 5' de las secuencias de los genes de la cadena ligera y pesada, el cual dirigía la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó usando un terminador de la transcripción doble *rrnB t1t2*. El gen *lacIq* codificaba la proteína represora Lac I expresada constitutivamente. Esta transcripción reprimida desde el promotor *tac* hasta que la falta de represión, estaba inducida por la presencia de alolactosa o IPTG. El origen de replicación utilizado era p15A, que conservaba un número bajo de copias. El plásmido contenía un gen de resistencia a la tetraciclina para la selección con antibióticos.

Ejemplo 5 - Expresión de Fab' anti-TNF o Fab' anti-TNF y DsbC en las cepas de *E. coli*

35 *Expresión de Fab' anti-TNF y DsbC*

La línea celular W3110 de tipo silvestre, la cepa MXE001 proporcionada en el Ejemplo 1 y la cepa mutante MXE012 (cepa mutante de spr H145A) proporcionada en el Ejemplo 3 se transformaron con el plásmido generado en el Ejemplo 4.

40 La transformación de las cepas se realizó utilizando el método encontrado en Chung C.T et al. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS 86:2172-2175 (1989).

Expresión de Fab' anti-TNF

45 La línea celular W3110 de tipo silvestre, las cepas de mutantes de spr MXE008, MXE012, MXE017 y MXE012 (cepa mutante de spr H145A) proporcionada en el Ejemplo 3 y la cepa MXE001 proporcionada en el Ejemplo 1, se transformaron con el plásmido pMXE117 (pTTO CDP870 o 40.4 IGS17), un vector de expresión para el Fab' CDP870 (un Fab' anti-TNF que tiene una secuencia de la cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 13 y una secuencia de la cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 14), se construyó usando metodologías convencionales de clonación por restricción que se pueden encontrar en Sambrook et al. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press, N.Y. El plásmido pMXE117 (pTTO CDP870 o 40.4 IGS17) contenía las siguientes características; un promotor *tac* fuerte y una secuencia de operador *lac*. Los genes de la cadena ligera y pesada de Fab se transcribieron como un solo mensaje dicistrónico. El ADN que codificaba el péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli*, se fusionó con el extremo 5' de ambas secuencias de los genes de la cadena ligera y pesada, que dirigía la translocación de los polipéptidos al periplasma de *E. coli*. La transcripción se terminó usando un terminador de la transcripción doble *rrnB t1t2*. El gen *lacIq* codificaba la proteína represora Lac I expresada constitutivamente. Esta transcripción reprimida desde el promotor *tac* hasta la falta de represión, estaba inducida por la presencia de alolactosa o IPTG. El origen de replicación utilizado era p15A, que conservaba un número bajo de copias. El plásmido contenía un gen de resistencia a la tetraciclina para la selección de antibióticos.

La transformación de las cepas se realizó utilizando el método encontrado en Chung C.T et al. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS 86:2172-2175 (1989).

Ejemplo 6 - Expresión de un Fab' anti-TNF en cepas mutadas de *E. coli* utilizando cultivos en matraces de agitación

5 Las siguientes cepas producidas como en el Ejemplo 5, que expresaban Fab' anti-TNF: W3110, MXE001, MXE012 y MXE017 se sometieron a ensayo en un experimento en matraz de agitación que comparaba el crecimiento y la expresión de Fab'.

El protocolo experimental del matraz de agitación utilizado se realizó de la siguiente manera:

Experimento en matraz de agitación de 5 ml

10 Se recogió una única colonia en 5 ml de LB más tetraciclina a 10 µg/ml y se cultivó durante una noche a 30°C con agitación a 250 rpm.

El cultivo nocturno se usó para inocular 100 ml más tetraciclina hasta una DO600 de 0,1 (es decir, para DO de 4, 100/4x01 = 2,5 ml en 100 ml)

Se establecieron tubos de cultivo de 3x5 ml para cada punto de tiempo requerido usando este cultivo maestro. Se estableció 1 cultivo de referencia para tomar muestras para la medición de la DO.

15 Los cultivos se agitaron a 30°C 250 rpm, controlando visualmente el crecimiento al principio, después tomando muestras del cultivo de referencia para detectar cultivos con una DO600 de 0,5 (generalmente aproximadamente 2 horas). Se añadió IPTG a cada tubo de cultivo a una concentración de 200 µM (25 µl de 0,04 M) una vez que el cultivo había alcanzado una DO superior a 0,5.

20 Los tubos de cultivo se retiraron en los puntos de tiempo requeridos, p. ej., 1 hora, 2 horas, después de la inducción y se conservaron sobre hielo.

25 Después de una centrifugación a 13.200 rpm durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de tampón de extracción periplásmico (Tris.Cl 100 mM/EDTA 10 mM pH 7,4). Los extractos periplásmicos se agitaron a 250 rpm durante una noche a 30°C. Al día siguiente, los extractos se centrifugaron durante 10 minutos a 13.200 rpm, el material sobrenadante se decantó y se almacenó a -20°C como "extracto periplásmico". El sedimento celular gastado se desechó.

Cuantificación con ELISA.

30 Se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4°C con AB141 (CH1 antihumano de conejo, UCB) a 2 µgml⁻¹ en PBS. Después de lavar 3 veces con 300 µl de muestra/tampón conjugado (PBS, BSA 0,2% (p/v), Tween 20 0,1% (v/v)), se realizaron ½ diluciones en serie de muestras y patrones en la placa, en 100 µl de muestra/tampón conjugado, y la placa se agitó a 250 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3x con 300 µl de tampón de lavado (PBS, Tween 20 0,1% (v/v)), se añadieron 100 µl del anticuerpo revelador 6062 (conjugado de kappa de conejo anti-humana y HRP, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido), después de una dilución a 1/1000 en muestra/tampón conjugado. La placa se agitó después a 250 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con 3x 300 µl de tampón de lavado, se añadieron 100 µl de sustrato TMB (mezcla 50:50 de solución TMB (Calbiochem): dH2O) y se registró la A₆₃₀ utilizando un lector de placas automatizado. La concentración de Fab' en los extractos periplásmicos se calculó mediante una comparación con los patrones de Fab' purificados con el isotipo apropiado.

La Figura 1 muestra el crecimiento mejorado de MXE012 y MXE017 en comparación con el de W3110 de tipo silvestre y MXE001.

40 La Figura 2 muestra una expresión mejorada de Fab' en MXE012 y MXE017 en comparación con W3110 de tipo silvestre y MXE001.

Ejemplo 7 - Crecimiento de cepas de *E. coli* que expresan Fab' anti-TNF o Fab' anti-TNF y DsbC utilizando fermentaciones de alta densidad

45 Se sometieron a ensayo las siguientes cepas, producida como en el ejemplo 5, en experimentos de fermentación que comparaban el crecimiento y la expresión de un Fab' anti-TNF:

Cepas que expresan Fab' anti-TNF producidas en el Ejemplo 5:

W3100

MXE012 (cepa mutante de spr H145A)

Cepas que expresan Fab' anti-TNF y DsbC producidas en el Ejemplo 5:

W3110

MXE012 (cepa mutante de spr H145A)

Medio de crecimiento.

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

Inóculo Los cultivos para el inóculo se cultivaron en el mismo medio complementado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación durante aproximadamente 22 horas.

- 10 **Fermentación.** Los fermentadores (2,5 litros de volumen total) se sembraron con cultivo del inóculo a DO_{600} 0,3-0,5. La temperatura se mantuvo a 30°C durante la fase de crecimiento y se redujo a 25°C antes de la inducción. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación de aire mediante agitación variable y flujo de aire. El pH del cultivo se controló a 7,0 mediante titulación automática con 15% (v/v) de NH_4OH y 10% (v/v) de H_2SO_4 conc. La espumación se controló mediante la adición de una solución de Struktol J673 al 10% (v/v) (Schill y Seilacher). Se realizaron varias adiciones en diferentes etapas de la fermentación. Cuando la concentración de la biomasa alcanzó aproximadamente una DO_{600} de 40, se añadieron sales de magnesio y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Otras adiciones de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se realizaron antes y durante la fase de inducción para asegurar que el fosfato se mantenía en exceso. Cuando el glicerol presente al comienzo de la fermentación se había agotado (aproximadamente una DO_{600} de 75), se aplicó un suministro continuo de 80% (p/p) de glicerol. En el mismo punto en la fermentación, se aplicó un suministro de IPTG a 170 μM . El inicio del suministro de IPTG se tomó como el inicio de la inducción. Las fermentaciones se ejecutaron normalmente durante 64-120 horas con tasas de suministro de glicerol (que variaban entre 0,5 y 2,5 ml/h).

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

- 25 **Extracción periplasmática.** Las células se recogieron a partir de las muestras de cultivo mediante centrifugación. La fracción de material sobrenadante se conservó (a -20°C) para un análisis posterior. La fracción del sedimento celular se resuspendió con el volumen de cultivo original en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM; pH 7,4). Después de una incubación a 60°C durante aproximadamente 16 horas, el extracto se clarificó mediante centrifugación y la fracción de material sobrenadante se conservó (a -20°C) para análisis.

- 30 **Cuantificación de Fab'.** Las concentraciones de Fab' en los extractos periplásmicos y el material sobrenadante del cultivo se determinaron mediante ELISA ensamblado con Fab' como se describe en Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320 y usando hplc con Proteína G. Se cargó una columna HiTrap Proteína-G HP de 1 ml (GE-Healthcare o equivalente) con el analito (pH aproximadamente neutro, 30°C, filtrado con 0,2 μm) a 2 ml/min, la columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 50 mM pH 7,4 y después el Fab' eluyó usando una inyección de glicina 50 mM/HCl pH 2,7. El Fab' eluido se midió mediante A280 en un sistema de HPLC Agilent 1100 o 1200 y se cuantificó haciendo referencia a una curva estándar de una proteína Fab' purificada de concentración conocida.

- 40 La Figura 3 muestra el perfil de crecimiento de W3110 y MXE012 que expresan Fab' anti-TNF durante la fermentación con un tiempo de ejecución prolongado. Los datos ilustran un pequeño aumento en la tasa de crecimiento inicial de la cepa de spr, en relación con el tipo silvestre durante la acumulación de biomasa y una mayor duración de la supervivencia de la cepa mutante de spr MXE012, en relación con la cepa W3110 de tipo silvestre en las últimas ~20 horas de fermentación.

- 45 La Figura 4 muestra la acumulación de Fab' periplásmico (líneas y símbolos negros) y la acumulación de Fab' en el medio (líneas discontinuas y símbolos blancos) para W3110 y MXE012 (W3110 spr H145A) que expresan Fab' anti-TNF durante la fermentación con un tiempo de ejecución prolongado. Los datos muestran que las tasas iniciales de acumulación de Fab' periplásmico son muy similares para las dos cepas, pero que las células W3110 de tipo silvestre pierden Fab' periplásmico más adelante en la fermentación, en comparación con MXE012.

- 50 La Figura 5 muestra el perfil de crecimiento de las cepas que expresan Fab' anti-TNFa W3110 y MXE012 y de las cepas que expresan Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante W3110 y MXE012. Se puede observar que las cepas que expresan DsbC muestran un crecimiento mejorado en comparación con las cepas de células correspondientes que no expresan DsbC recombinante. También se puede observar que la presencia de la mutación de spr en las cepas mejora el crecimiento celular.

- 55 La Figura 6 muestra el rendimiento total de Fab del periplasma (símbolos sombreados) y del material sobrenadante (símbolos blancos sin sombreado) procedente de las cepas de *E. coli* que expresan Fab' anti-TNFa, W3110 y MXE012 y procedente de las cepas de *E. coli* que expresan Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante, W3110 y MXE012. En este gráfico se puede observar que las cepas que expresan DsbC recombinante producían un alto rendimiento de Fab' anti-TNFa, en donde la cepa MXE012 producía más de 3,0 g/L en aproximadamente 92 horas. También se puede

observar que las cepas MXE012 que son portadoras de un gen spr mutante mostraban una lisis reducida en comparación con las cepas W3110 que se pueden observar como con menos Fab' anti-TNFa en el material sobrenadante (símbolos blancos).

Ejemplo 8 - Determinación de la fuga de ADN y la cantidad total de proteína en las cepas

5 Ensayo de ADNds:

La fuga de ADN bicatenario al material sobrenadante de las cepas W3110, MXE001, MXE008 y MXE012 se determinó utilizando el kit de ensayo de ADNds Quant-IT Picogreen (Invitrogen, Ref: P11496). Se preparó una curva estándar diluyendo el patrón de ADN proporcionado en el intervalo de 1-1000 ng/ml. Las muestras se diluyeron en tampón TE, de modo que la lectura de la fluorescencia estaba dentro del intervalo lineal del método (500 a 1000 veces). En una placa de 96 pocillos, se mezclaron 100 µL de muestra diluida o de patrón con 100 µL del reactivo Picogreen, y la placa se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Los recuentos de la fluorescencia se midieron durante 0,1 s usando un filtro de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 535 nm. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ensayo de proteínas:

15 La concentración total de proteínas de las cepas W3110, MXE001, MXE008 y MXE012 se determinó usando el kit de ensayo Coomassie Plus Bradford (Pierce, Ref: 23236). Se realizó una curva estándar diluyendo el patrón de albúmina de suero bovino en un intervalo de 25-1000 µg/ml. Las muestras se diluyeron en agua de modo que la densidad óptica estuviera dentro del intervalo lineal del método (5 a 10 veces), y 33 µL de la muestra o del patrón se mezclaron con 1 ml de reactivo de Coomassie. Después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se leyó la $DO_{595\text{ nm}}$ en un espectrofotómetro con reactivo de Coomassie como blanco. La concentración total de proteínas se calculó en base a la curva estándar. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 9 Crecimiento de cepas de *E. coli* que expresan Fab' anti-TNF y DsbC utilizando fermentaciones a gran escala

25 La siguiente cepa, producida como en el ejemplo 5, se sometió a ensayo en experimentos de fermentación que comparaban el crecimiento y la viabilidad de la cepa y la expresión de un Fab' anti-TNFa:

MXE012 (mutante de spr H145A) que expresaba Fab' anti-TNF y DsbC producido en el Ejemplo 5

Las fermentaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera:

30 Las células MXE012 que expresaban Fab' anti-TNF y DsbC se cultivaron inicialmente usando un medio complejo de extracto de levadura y peptona en un cultivo en matraz de agitación. A continuación, las células se transfirieron a un fermentador en estadio de siembra usando un medio definido químicamente. Las células se cultivaron en condiciones no limitantes de nutriente hasta un punto de transferencia definido. Después, las células se transfirieron entonces a un fermentador de producción de 250 L usando un medio similar definido químicamente, con un volumen final de aproximadamente 230 L. El cultivo creció inicialmente en modo discontinuo hasta el agotamiento de la fuente de carbono. Después del agotamiento de la fuente de carbono, se suministró un suministro que limitaba la fuente de carbono con una tasa que crecía exponencialmente. Después de la adición de una cantidad definida de fuente de carbono, la tasa de adición de la solución de suministro se redujo y se añadió IPTG para inducir la expresión de Fab'. La fermentación continuó después y el Fab' se acumuló en el periplasma. En un período definido después de la inducción, el cultivo se recogió por centrifugación y se extrajo el Fab' de las células, resuspendiendo las células recogidas en un tampón Tris y EDTA y calentando a 59°C.

40 Los perfiles de crecimiento de las fermentaciones se determinaron midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

Los títulos de Fab' se determinaron por HPLC con proteína G como se ha descrito en el Ejemplo 7 anterior, excepto que durante la extracción periplásmica se usaron células de nuevo aporte y se añadió 1 ml de tampón de extracción al cultivo celular. El Fab' del material sobrenadante y periplásmico se midió como se ha descrito en el Ejemplo 7. La Figura 12 muestra el título de Fab' periplásmico.

45 La viabilidad del cultivo celular se midió mediante citometría de flujo usando clasificación celular activada por fluorescencia.

La Figura 11 muestra los perfiles de crecimiento de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante.

50 La Figura 12 muestra los títulos de Fab' anti-TNFa periplásmico de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante.

La Figura 13 muestra las viabilidades de fermentaciones de 200 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante.

Ejemplo 10 Crecimiento de cepas de *E. coli* que expresan Fab' anti-TNF y DsbC utilizando fermentaciones a gran escala

La siguiente cepa, producida como en el ejemplo 5, se sometió a ensayo en experimentos de fermentación que comparaban el crecimiento de la cepa y la expresión de un Fab' anti-TNFa:

5 MXE012 expresaba Fab' anti-TNF y DsbC producido en el Ejemplo 5

Las fermentaciones se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 9 con un fermentador de producción de 3000 L que contenía un volumen final de aproximadamente 2650 L.

Los perfiles de crecimiento de las fermentaciones se determinaron midiendo la densidad óptica de un cultivo a 600 nm.

10 Los títulos de Fab' se determinaron mediante HPLC con proteína G como se ha descrito en el Ejemplo 9 anterior.

La Figura 14 muestra los perfiles de crecimiento de fermentaciones de 3000 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante.

La Figura 15 muestra los títulos de Fab' anti-TNFa periplásmico de fermentaciones de 3000 L de una cepa MXE012 que expresa Fab' anti-TNFa y DsbC recombinante..

15 Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente haciendo referencia a realizaciones preferidas, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y el detalle sin apartarse del alcance de la invención tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> UCB PHARMA S.A.

20 <120> CEPA HOSPEDADORA BACTERIANA

<130> G0105-WO

<150> GB1000590.8

<151> 14-01-2010

<160> 39

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2049

<212> ADN

<213> *E. coli*

30 <400> 1

ES 2 747 981 T3

atgaacatgt tttttaggct taccgcgta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60
 ttcgctgtag aagatatcac gcgtgctgat caaattccgg tattaagga agagacgcag 120
 catgcgacgg taagtgagcg cgtaacgtcg cgcttcaccc gttctcatta tcgccagttc 180
 gacctcgatc aggcatthtc ggccaaaatc tttgaccgct acctgaatct gctcgattac 240
 agccacaacg tgctgctggc aagcgatggt gaacagttcg cgaaaaagaa aaccgagtta 300
 ggcgatgaac tgcgttcagg caaactcgac gttttctacg atctctacaa tctggcgcaa 360
 aagcgccggt ttgagcgta ccagtagcgt ttgtcggtag tggaaaagcc gatggatttc 420
 accggcaacg acacttataa ccttgaccgc agcaaaagcg cctggccgaa aaacgaggct 480
 gagttgaacg cgctgtggga cagtaaagtc aaattcgacg agttaagcct gaagctgaca 540
 ggaaaaacgg ataagaaat tcgtgaaacc ctgactcgcc gctacaaatt tgccattcgt 600
 cgtctggcgc aaaccaacag cgaagatggt ttctcgctgg caatgacggc gtttgcgctg 660
 gaaatcgacc cgcataccaa ctatctttcc ccgcgtaata ccgaacagtt caaactgaa 720
 atgagtttgt cgctggaag tattggcgca gtgctgcaaa tggatgatga ctacaccggt 780
 atcaattcga tggggcagc tgggtccgca gcgaagagta aagctatcag cgttggtagc 840
 aaaattgtcg gtgttggtca aacaggcaag ccgatgggtg acgtgattgg ctggcgtctt 900
 gatgatgtgg ttgccttaat taaagggccg aagggcagta aagttcgtct ggaaatttta 960
 cctgctggta aagggaccaa gaccctact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc 1020
 gaagaccgcg cggttaaaat gtcggtgaag accgtcggta aagagaaagt cggcgtgctg 1080
 gatattccgg gcttctatgt gggtttgaca gacgatgtca aagtgcaact gcagaaactg 1140
 gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcatc gacctcgta gcaatggcgg tggggcgta 1200
 actgaagccg tategctctc cggctctgtt attcctgagg gtccattgt tcaggtccgc 1260
 gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gataccgacg gacaggtttt ctataaaggc 1320
 ccgctggtgg tgctggttga ccgcttcagt gcttcggctt cagaaatctt tgccgcggca 1380
 atgcaggatt acggtcgtgc gctggttggt ggtgaaccga cgtttggtaa aggcaccggt 1440
 cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggccagcg 1500
 ctgggttctg tgcagtacac gatccagaaa ttctatcgcg ttaacggcgg cagtacgcaa 1560
 cgtaaaggcg taacgccaga catcatcatg ccgacgggta atgaagaaac ggaaacgggt 1620
 gagaaattcg aagataacgc gctgccgtgg gatagcattg atgccgcgac ttatgtgaaa 1680
 tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgctgaagg aacataatgc gcgtatcgcg 1740
 aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatcgcg gcttcaacgc tatgaaggac 1800
 aagcgcaata tcgtttctct gaattacgct gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat 1860
 gcgacgcgctc tggcgcgttt gaacgaacgc tttaaacgcg aaggtaaacc ggagttgaag 1920
 aaactggatg atctaccgaa agattaccag gagccggatc cttatctgga tgagacggtg 1980
 aatatcgcac tcgatctggc gaagctttaa aaagccagac ccgcggaaca acccgctccc 2040
 gtcaagtaa 2049

<210> 2
 <211> 682

ES 2 747 981 T3

<212> PRT
 <213> E. coli

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Lys Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Gln
115        120        125
  
```

5

ES 2 747 981 T3

Tyr Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys Pro Met Asp Phe Thr Gly Asn Asp
 130 135 140

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

Glu Leu Asn Ala Leu Trp Asp Ser Lys Val Lys Phe Asp Glu Leu Ser
 165 170 175

Leu Lys Leu Thr Gly Lys Thr Asp Lys Glu Ile Arg Glu Thr Leu Thr
 180 185 190

Arg Arg Tyr Lys Phe Ala Ile Arg Arg Leu Ala Gln Thr Asn Ser Glu
 195 200 205

Asp Val Phe Ser Leu Ala Met Thr Ala Phe Ala Arg Glu Ile Asp Pro
 210 215 220

His Thr Asn Tyr Leu Ser Pro Arg Asn Thr Glu Gln Phe Asn Thr Glu
 225 230 235 240

Met Ser Leu Ser Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Gln Met Asp Asp
 245 250 255

Asp Tyr Thr Val Ile Asn Ser Met Val Ala Gly Gly Pro Ala Ala Lys
 260 265 270

Ser Lys Ala Ile Ser Val Gly Asp Lys Ile Val Gly Val Gly Gln Thr
 275 280 285

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Met Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

ES 2 747 981 T3

<211> 2048
 <212> ADN
 <213> E. coli

<400> 3

atgaattcgt	ttttaggctt	accgcgtag	ctggcctgct	tgcaatagca	ggccagacat	60
taattgtaga	agatatcacg	cgtgctgac	aaattccggt	attaaaggaa	gagacgcagc	120
atgcgacggt	aagtgagcgc	gtaacgtcgc	gcttcacccg	ttctcattat	cgccagttcg	180
acctcgatca	ggcattttcg	gccaaaatct	ttgaccgcta	cctgaatctg	ctcgattaca	240
gccacaacgt	gctgctggca	agcgatgttg	aacagttcgc	gaaaaagaaa	accgagttag	300
gcatgaact	gcgttcaggc	aaactcgacg	tttctacga	tctctacaat	ctggcgcaaa	360
agcgcctgtt	tgagcgctac	cagtacgctt	tgctcggtact	ggaaaagccg	atggatttca	420
ccggcaacga	cacttataac	cttgaccgca	gcaaagcgcc	ctggccgaaa	aacgaggctg	480
agttgaacgc	gctgtgggac	agtaaagtca	aattcgacga	gttaagcctg	aagctgacag	540
gaaaaacgga	taaagaaatt	cgtgaaaccc	tgactcgccg	ctacaaattt	gccattcgtc	600
gtctggcgca	aaccaacagc	gaagatgttt	tctcgctggc	aatgacggcg	tttgcgcgtg	660
aatcgaccc	gcataccaac	tatctttccc	cgctgaatac	cgaacagttc	aacactgaaa	720
tgagtttgtc	gctggaaggt	attggcgagc	tgctgcaaat	ggatgatgac	tacaccgtta	780
tcaattcgat	ggtggcaggt	ggtccggcag	cgaagagtaa	agctatcagc	gttggtgaca	840
aaattgtcgg	tgttgggtcaa	acaggcaagc	cgatggttga	cgtgattggc	tggcgtcttg	900
atgatgtggt	tgcttaatt	aaagggccga	agggcagtaa	agttcgtctg	gaaattttac	960
ctgctggtaa	agggaccaag	accgtagctg	taacgttgac	ccgtgaacgt	attcgtctcg	1020
aagaccgcbc	ggttaaaatg	tcgggtgaaga	ccgtcggtaa	agagaaagtc	ggcgtgctgg	1080
atattccggg	cttctatgtg	ggtttgacag	acgatgtcaa	agtgcaactg	cagaaactgg	1140
aaaaacagaa	tgtcagcagc	gtcatcatcg	acctgcgtag	caatggcggg	ggggcgtaa	1200
ctgaagccgt	atcgctctcc	ggtctgttta	ttcctgcggg	tcccattggt	caggtccgcg	1260
ataacaacgg	caaggttcgt	gaagatagcg	ataccgacgg	acaggttttc	tataaaggcc	1320
cgctggtggt	gctgggtgac	cgcttcagtg	cttcggcttc	agaaatcttt	gccgcggcaa	1380
5 tgcaggatta	cggtcgtgcg	ctggttgtgg	gtgaaccgac	gtttggtaaa	ggcaccgttc	1440

ES 2 747 981 T3

agcaataccg ttcattgaac cgtatttacg atcagatggt acgtcctgaa tggccagcgc 1500
 tgggttctgt gcagtacacg atccagaaat tctatcgcgt taacggcggc agtacgcaac 1560
 gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg 1620
 agaaattcga agataacgcg ctgccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat 1680
 caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcgcga 1740
 aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcg cttcaacgct atgaaggaca 1800
 agcgcaatat cgtttctctg aattacgctg tgctgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
 cgacgcgtct ggcgcgtttg aacgaacgct ttaaaccgca aggtaaaccg gagttgaaga 1920
 aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacggtga 1980
 atatcgcaact cgatctggcg aagcttgaaa aagccagacc cgcggaacaa cccgctcccg 2040
 tcaagtaa 2048

<210> 4
 <211> 2889
 <212> ADN
 <213> E. coli

5

<400> 4
 atgccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgccctttg ggcaccctta 60
 agtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120
 aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat 180
 ccgcaggcag ttaaatcgct ctccggcgtg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc 240
 gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaag 300
 taccgcagag ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
 agcactgcgc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgacgc cttgcctggt 420
 gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa 480
 cgtgagcgtg atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc 540
 atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaa gttttctggt 600
 ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660
 ttccacgaga agtactattc cgccaattg atgaaggcgg ttatttacag taataaaccg 720
 ctgccggagt tggcaaaaat ggcggcggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc 780
 aaaaaaccgg aaatcacctg gccggtagtc accgacgcgc aaaagggcat tatcattcat 840
 tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgtg cgcttgagt ttcgcatcga taacaactca 900
 gcgaagttcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca 960
 ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc 1020
 gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgtg ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa 1080

ES 2 747 981 T3

ggccctggcta atcgcgatca ggttgtggcg gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt 1140
 gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc 1200
 cgttatccgt cgatcacccg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt 1260
 cgcgttcoctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa 1320
 gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc 1380
 ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgcctgatca ggctcgataaa 1440
 atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg 1500
 ccagagotta accottatat tcctgatgat ttctcgtgta ttaagtcaga gaagaaatac 1560
 gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagccgt 1620
 tattttgcc a gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
 gacagcgcgc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagc gctggcgcctt 1740
 gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggg ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac 1800
 ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctgtt ccaggcattg 1860
 ctcgaggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg 1920
 tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgcc 1980
 gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgcc 2040
 tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagc ggctcgacca 2100
 gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccagggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
 caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgcgaa acaaagatgt agtggctgat 2220
 aaaaaacaat ccgtcatcct tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
 gtatttgtac cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgggg 2340
 cagatcgtac agccgtggtt ctacaatcag ttgctgaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
 gtgtttgctg ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
 aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
 gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcagc ggtaattacc 2580
 cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taagatttc 2640
 gatcgcggca atatgctcct cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
 acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat cagggcgtgg tcgagccgca aggcattgct 2760
 attctgtcgc agatttccgg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcggtt cagcaaacaa tgcccctgat gagtgaaaag 2880
 aatgagtga 2889
 <210> 5
 <211> 962
 <212> PRT
 <213> E. coli
 <400> 5

5

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Pro Gly Ser Lys Phe Ser Gly Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ser Asp
195 200 205

Lys Pro Gly Asn Pro Val Gln Gln Ala Leu Lys Asp Phe His Glu Lys
210 215 220

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

ES 2 747 981 T3

Leu Pro Glu Leu Ala Lys Met Ala Ala Asp Thr Phe Gly Arg Val Pro
 245 250 255
 Asn Lys Glu Ser Lys Lys Pro Glu Ile Thr Val Pro Val Val Thr Asp
 260 265 270
 Ala Gln Lys Gly Ile Ile Ile His Tyr Val Pro Ala Leu Pro Arg Lys
 275 280 285
 Val Leu Arg Val Glu Phe Arg Ile Asp Asn Asn Ser Ala Lys Phe Arg
 290 295 300
 Ser Lys Thr Asp Glu Leu Ile Thr Tyr Leu Ile Gly Asn Arg Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Thr Leu Ser Asp Trp Leu Gln Lys Gln Gly Leu Val Glu Gly Ile
 325 330 335
 Ser Ala Asn Ser Asp Pro Ile Val Asn Gly Asn Ser Gly Val Leu Ala
 340 345 350
 Ile Ser Ala Ser Leu Thr Asp Lys Gly Leu Ala Asn Arg Asp Gln Val
 355 360 365
 Val Ala Ala Ile Phe Ser Tyr Leu Asn Leu Leu Arg Glu Lys Gly Ile
 370 375 380
 Asp Lys Gln Tyr Phe Asp Glu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Phe
 385 390 395 400
 Arg Tyr Pro Ser Ile Thr Arg Asp Met Asp Tyr Val Glu Trp Leu Ala
 405 410 415
 Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn
 420 425 430
 Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met
 435 440 445
 Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro
 450 455 460
 His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys
 465 470 475 480
 Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile
 485 490 495
 Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser

ES 2 747 981 T3

500	505	510
Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp 515 520 525		
Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser 530 535 540		
Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met 545 550 555 560		
Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala 565 570 575		
Gly Leu Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Gln Ala Ser Val Gly Gly Ile 580 585 590		
Ser Phe Ser Thr Asn Ala Asn Asn Gly Leu Met Val Asn Ala Asn Gly 595 600 605		
Tyr Thr Gln Arg Leu Pro Gln Leu Phe Gln Ala Leu Leu Glu Gly Tyr 610 615 620		
Phe Ser Tyr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Glu Gln Ala Lys Ser Trp 625 630 635 640		
Tyr Asn Gln Met Met Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Ala Phe Glu Gln 645 650 655		
Ala Ile Met Pro Ala Gln Met Leu Ser Gln Val Pro Tyr Phe Ser Arg 660 665 670		
Asp Glu Arg Arg Lys Ile Leu Pro Ser Ile Thr Leu Lys Glu Val Leu 675 680 685		
Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Ser Gly Ala Arg Pro Glu Phe Met Val 690 695 700		
Ile Gly Asn Met Thr Glu Ala Gln Ala Thr Thr Leu Ala Arg Asp Val 705 710 715 720		
Gln Lys Gln Leu Gly Ala Asp Gly Ser Glu Trp Cys Arg Asn Lys Asp 725 730 735		
Val Val Val Asp Lys Lys Gln Ser Val Ile Phe Glu Lys Ala Gly Asn 740 745 750		
Ser Thr Asp Ser Ala Leu Ala Ala Val Phe Val Pro Thr Gly Tyr Asp 755 760 765		

ES 2 747 981 T3

Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ile Val Gln
770 775 780

Pro Trp Phe Tyr Asn Gln Leu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Gly Tyr Ala
785 790 795 800

Val Phe Ala Phe Pro Met Ser Val Gly Arg Gln Trp Gly Met Gly Phe
805 810 815

Leu Leu Gln Ser Asn Asp Lys Gln Pro Ser Phe Leu Trp Glu Arg Tyr
820 825 830

Lys Ala Phe Phe Pro Thr Ala Glu Ala Lys Leu Arg Ala Met Lys Pro
835 840 845

Asp Glu Phe Ala Gln Ile Gln Gln Ala Val Ile Thr Gln Met Leu Gln
850 855 860

Ala Pro Gln Thr Leu Gly Glu Glu Ala Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe
865 870 875 880

Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln
885 890 895

Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala
900 905 910

Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser
915 920 925

Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp
930 935 940

Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys
945 950 955 960

Asn Glu

<210> 6

<211> 2915

<212> ADN

5 <213> E. coli

<400> 6

attccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgcccttg ggcacattaa 60

tgtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120

aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat 180

ES 2 747 981 T3

ccgcaggcag ttaaactcgct ctcggcgctg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc 240
 gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag 300
 taccgcgagc ctgacagtct ggccgaatat ctcaaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
 agcaactgcgc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagtgg agaacgacgc cttgcctggt 420
 gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa 480
 cgtgagcgta atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc 540
 atggcacagc tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt 600
 ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660
 ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaagcggg ttatttacag taataaacgg 720
 ctgccggagt tggcaaaaat ggcgcgggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc 780
 aaaaaaccgg aaatcaccgt gccggtagtc accgacgcgc aaaagggcat tatcattcat 840
 tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcggtgagt ttcgcatcga taacaactca 900
 gcgaagtcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca 960
 ggtacacttt ctgactggct gcaaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc 1020
 gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgctcttt aaccgataaa 1080
 ggcctggcta atcgcgatca ggttgtggcg gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt 1140
 gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc 1200
 cgttatccgt cgatcaccgg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt 1260
 cgcgttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa 1320
 gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc 1380
 ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgcctatca ggtcgataaa 1440
 atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg 1500
 ccagagctta acccttatat tcctgatgat ttctcgtga ttaagtcaaa gaagaaatac 1560
 gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg ttggtgatgc gccaaagccgt 1620
 tattttgccg gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
 gacagcggcc gcaatcaggc gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgctt 1740
 gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggg ggcataagtt tttccaccaa cgetaacaac 1800
 ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctggt ccaggcattg 1860
 ctcgaggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtctggt 1920
 tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
 gcgcagatgc tctcgaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc 2040
 tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggetcgacca 2100

ES 2 747 981 T3

gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcatgtg 2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgcgaa acaaagatgt agtggtcgat 2220
aaaaaacaat ccgtcatcct tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
gtatttgtac cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgggg 2340
cagatcgtac agccgtgggt ctacaatcag ttgctgaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
gtgtttgogt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggtaattacc 2580
cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taaagatttc 2640
gatcgcggca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg tcgagccgca aggcattgct 2760
attctgtcgc agatttccgg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaaaaca tgcccctgat gagtgaaaag 2880
aatgagtgat gtcgccgaga cactagatcc tttgc 2915

<210> 7
<211> 1425
<212> ADN
<213> E. coli

5

<400> 7
atgaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct 60
ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtggcca gcattaacgt agaaggtagc 180
acaaccgtta atacgccgcg tatgccgctt aatttccagc agttcttcgg tgatgattct 240
ccgttctgcc aggaaggttc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
ggtaaatggtg gcggccagca acagaaattc atggcgcgtg gttccggcgt catcattgat 360
gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttggtg ataacgcgac ggtcattaaa 420
gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
gatatcgcgc tgatccaaat ccagaaccgc aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccctgt tggctctgggc 600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctcgc ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactccgg tggcgcgctg 720
gttaacctga acggcgaact gatcggatc aacaccgca tcctcgcacc ggacggcggc 780
aacatcggta tcggttttgc tatcccagat aacatggtga aaaacctgac ctccgagatg 840
gtggaatacg gccagggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaaactcc 900

ES 2 747 981 T3

gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
 cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
 ggtaagccga tcagcagctt tgccgactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
 agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgct 1200
 gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcaact 1260
 ccggctgctc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

<210> 8
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> E. coli

5

<400> 8
 Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 981 T3

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

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

5

<400> 9
 atgaaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct 60
 ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtggctca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgtta atacgccgcg tatgccgctg aatttccagc agttcttcgg tgatgattct 240
 ccgttctgcc aggaagggtc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
 ggtaatggtg gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
 gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttggtg ataacgcgac ggtcattaaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
 gatatcgcgc tgatccaaat ccagaaccgc aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgogtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccctgt tggctctgggc 600
 gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
 tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacgcccg tgggtgcgctg 720
 gttaacctga acggcgaact gatcggatc aacaccgcga tcctcgcacc ggacggcggc 780
 aacatcggtg tcggttttgc tatcccgagt aacatggtg aaaaacctgac ctcgcagatg 840
 gtggaatacg gccaggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc 900
 gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
 cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctcactgaac 1020
 ggtaagccga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
 agcaaaactg ccctgggctt actgcccagc ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgtc 1200
 gagatgagca acaaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcaact 1260
 ccggctcgcg agatcggcct gaagaaaggc gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctcgacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

10 <210> 10
 <211> 474
 <212> PRT

ES 2 747 981 T3

<213> E. coli

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln

465 470

- 5 <210> 11
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> hTNF40-gL1
- 10 <400> 11

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 12
<211> 118
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> gh3h TNF40.4

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 747 981 T3

<223> Cadena Ligera Injertada

<400> 13

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5

<210> 14

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Cadena Pesada Injertada

<400> 14

ES 2 747 981 T3

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

His Thr Cys Ala Ala
225

5 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

10 <400> 15
 gcatcataat tttctttta cctc 24

<210> 16
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

 5 <400> 16
 gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

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

 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

 <400> 17
 gtgccaggag atgcagcagc ttgc 24

 15 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador oligonucleótido

 <400> 18
 tttgcagcca gtcagaaagt g 21

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

 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

 <400> 19
 30 ctgcctgcga ttttcgccgg aacg 24

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

 35 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

 <400> 20
 cgcatggtac gtgccacgat atcc 24

 <210> 21
 40 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <400> 21

ES 2 747 981 T3

Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 22
- 5 <211> 162
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <400> 22

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser

<210> 23

5 <211> 951

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia OmpT mutada

10 <400> 23

ES 2 747 981 T3

```

atgcgggga aacttctggg aatagtcctg acaacccta ttgcatcag ctcttttgc 60
tctaccgaga ctttatcgtt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact 120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagccgaag aaggaggccg aaaagtcagt 180
caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg 240
atgccccaga tatctatcgg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
atggtcgcgc aggactggat ggattccagt aaccccgga cctggacgga tgaaagtaga 360
cacctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggccggat atcaggaaaag ccgttatagc 480
tttacagcca gaggtgggtc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc 540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaaac aacgttttaa aatgccctac 600
attggcttga ctggaagtta tcggtatgaa gattttgaac tcggtggcac atttaaatac 660
agcggctggg tggaatcatc tgataacgct gaagcttatg acccgggaaa aagaatcact 720
tatcgcagta aggtcaaaga ccaaaattac tattctggtg cagtcaatgc aggttattac 780
gtcacaccta acgcaaaagt ttatggtgaa ggcgcatgga atcgggttac gaataaaaaa 840
ggtaatactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aatggagca 900
ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt t 951

```

<210> 24

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia OmpT mutada

<400> 24

```

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

```

```

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

```

10

ES 2 747 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 747 981 T3

<220>

<223> Secuencia OmpT mutada

<400> 25

```

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

```

5

<210> 26

<211> 729

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia DsbC mutada

<400> 26

```

atgaagaaag gttttatggt gtttactttg ttagcggcgt tttcaggctt tgctcaggct 60
gatgacgcgg caattcaaca aacgttagcc aaaatgggca tcaaaagcag cgatattcag 120
cccgcgctg tagctggcat gaagacagtt ctgactaaca gcggcgtggt gtacatcacc 180
gatgatggta aacatatcat tcaggggcca atgtatgacg ttagtggcac ggctccggtc 240
aatgtcacca ataagatgct gttaaagcag ttgaatgccc ttgaaaaaga gatgatcgtt 300
tataaagcgc cgcaggaaaa acacgctatc accgtgttta ctgatattac ctgtggttac 360
tgccacaaac tgcattgagca aatggcagac tacaacgcgc tggggatcac cgtgcgttat 420
cttgctttcc cgcgccaggg gctggacagc gatgcagaga aagaaatgaa agctatctgg 480
tgtgcgaaag ataaaaacaa agcgtttgat gatgtgatgg caggtaaaag cgtcgcacca 540
gccagttgcg acgtggatat tgccgaccat tacgcacttg gcgtccagct tggcgttagc 600
ggtaactcgg cagttgtgct gagcaatggc aacttgttc cgggttacca gccgccgaaa 660
gagatgaaag aatctctcga cgaacaccaa aaaatgacca gcggtaaaaca ccatcaccat 720
caccactaa 729

```

ES 2 747 981 T3

<210> 27
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia DsbC mutada

<400> 27
 Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
 180 185 190
 Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys His His His His
 225 230 235 240

10 His His

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: hTNF40 CDRH1

<400> 28
 Asp Tyr Gly Met Asn
 1 5

10 <210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRH2 híbrida de hTNF40 humano

15 <400> 29
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRH3 de hTNF40

<400> 30
 Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

25 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRL1 de hTNF40

<400> 31
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRL2 de hTNF40

<400> 32
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

40 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRL3 de hTNF40

ES 2 747 981 T3

<400> 33
 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 34
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: CDRH2 de hTNF40

<400> 34
 10 Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Val Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 35
 <211> 84
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> adaptador de oligonucleótidos OmpA

<400> 35
 tcgagttcta gataacgagg cgtaaaaaat gaaaagaca gctatcgcaa ttgcagtggc 60

20 cttggctctg acgtacgagt cagg 84

<210> 36
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> casete-1 IGS

<400> 36
 gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggagagtgt taatgaagaa gactgctata 60

gcaattg 67

<210> 37
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> casete-2 IGS

<400> 37
 35 gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt taaatgaag aagactgcta 60

tagcaattg 69

<210> 38
 <211> 81
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> casete-3 IGS

<400> 38

ES 2 747 981 T3

gagctcacca gtaacaaaaa gctttaatag aggagagtgt tgaggaggaa aaaaaaatga 60

agaaaactgc tatagcaatt g 81

<210> 39

<211> 81

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> casete-4 IGS

<400> 39

gagctcacca gtaacaaaaa gctttaatag aggagagtgt tgacgaggat tatataatga 60

agaaaactgc tatagcaatt g 81

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una proteína recombinante de interés que comprende cultivar una célula bacteriana gram-negativa recombinante en un medio de cultivo en condiciones eficaces para expresar la proteína recombinante de interés y recuperar la proteína recombinante de interés a partir del periplasma de la célula bacteriana gram-negativa recombinante y/o del medio de cultivo, caracterizado porque la célula bacteriana gram-negativa recombinante comprende
- (a) un gen *spr* mutante que codifica una proteína *spr* mutante capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen *Tsp* mutado, en donde el gen *spr* mutante codifica una proteína *spr* que tiene una mutación en el aminoácido H145 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y
- 10 (b) un gen *Tsp* cromosómico no recombinante de tipo silvestre,
- en donde la célula es isogénica a una célula de *E. coli* de tipo silvestre a excepción del gen *spr* mutado.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el gen *spr* mutante codifica una proteína *spr* que tiene la mutación H145A, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la célula comprende además un polinucleótido recombinante que codifica DsbC.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula comprende además uno o varios de los siguientes genes mutados:
- a) un gen *DegP* mutado que codifica una proteína *DegP* que tiene actividad chaperona y actividad proteasa reducida;
- 20 b) un gen *ptr* mutado, en donde el gen *ptr* mutado codifica una proteína Proteasa III que tiene actividad proteasa reducida o es un gen *ptr* mutado por inactivación; y
- c) un gen *OmpT* mutado, en donde el gen *OmpT* mutado codifica una proteína *OmpT* que tiene actividad proteasa reducida o es un gen *OmpT* mutado por inactivación.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula comprende un vector que comprende el polinucleótido recombinante que codifica DsbC y la secuencia de polinucleótido que codifica una proteína de interés.
6. El método según la reivindicación 5, en el que el vector comprende un promotor que controla la expresión del polinucleótido recombinante que codifica DsbC y la secuencia del polinucleótido que codifica una proteína de interés.
- 30 7. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno.
8. El método según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno es específico de TNF.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína recombinante de interés se recupera a partir del periplasma y/o del material sobrenadante.
- 35 10. El método según la reivindicación 9, que comprende aguas abajo la etapa de procesamiento adicional de PEGilación de la proteína de interés.
11. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la célula de *E. coli* es W3110.
12. Una célula bacteriana gram-negativa recombinante que comprende:
- 40 (a) un gen *spr* mutante que codifica una proteína *spr* mutante capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen *Tsp* mutado, en donde el gen *spr* mutante codifica una proteína *spr* que tiene una mutación en el aminoácido H145 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y
- (b) un gen *Tsp* cromosómico no recombinante de tipo silvestre,
- en donde la célula es isogénica a una célula de *E. coli* de tipo silvestre a excepción del gen *spr* mutado.
13. Una célula W3110 de *E. coli* recombinante que comprende:
- 45 (a) un gen *spr* mutante que codifica una proteína *spr* mutante capaz de suprimir el fenotipo de una célula que comprende un gen *Tsp* mutado, en donde el gen *spr* mutante codifica una proteína *spr* que tiene una mutación en el aminoácido H145 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y

(b) un gen *Tsp* cromosómico no recombinante de tipo silvestre.

Figura 1

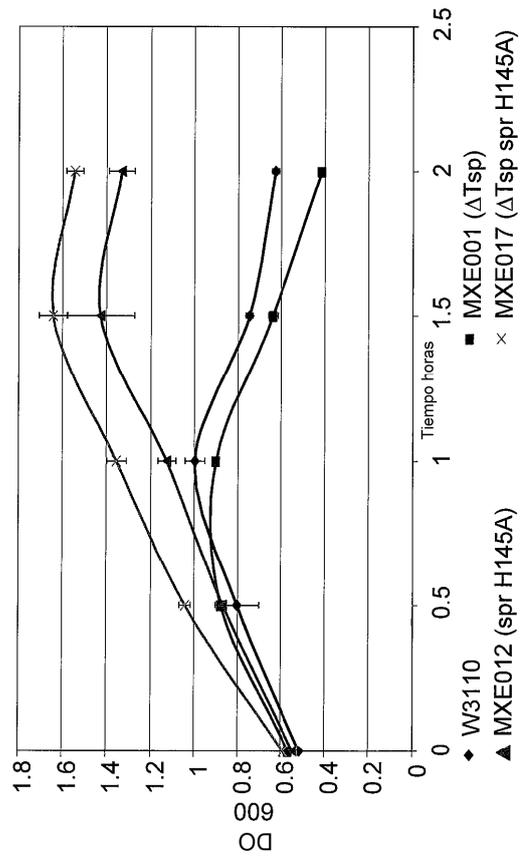
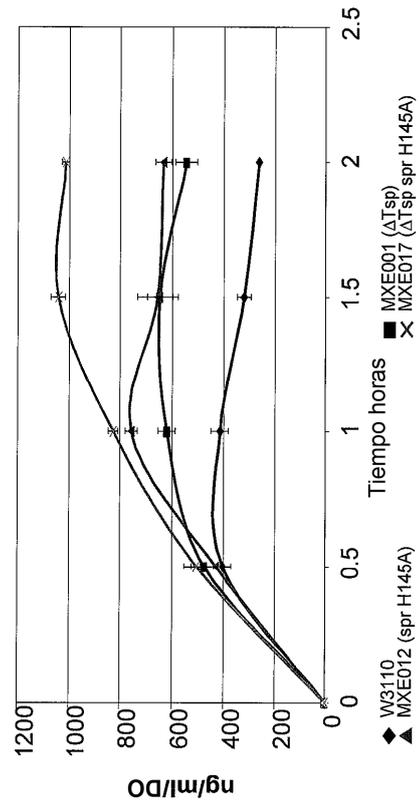
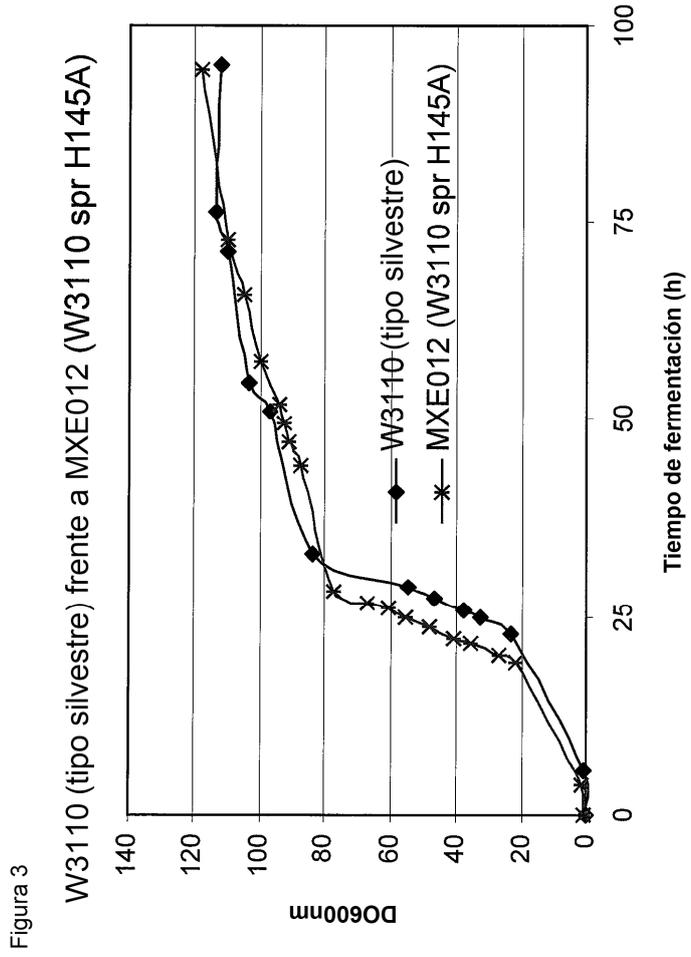
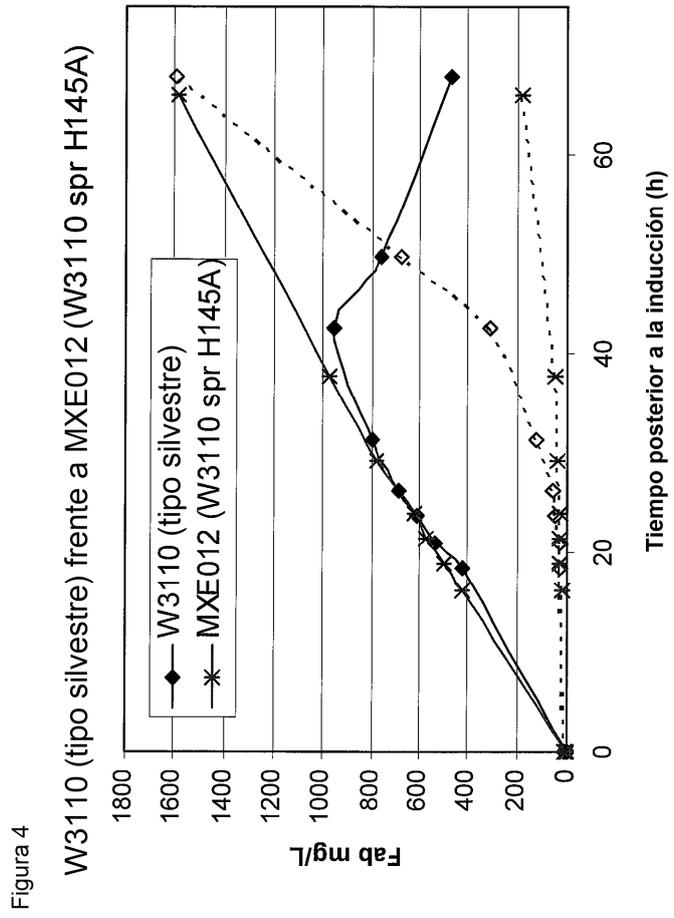


Figura 2







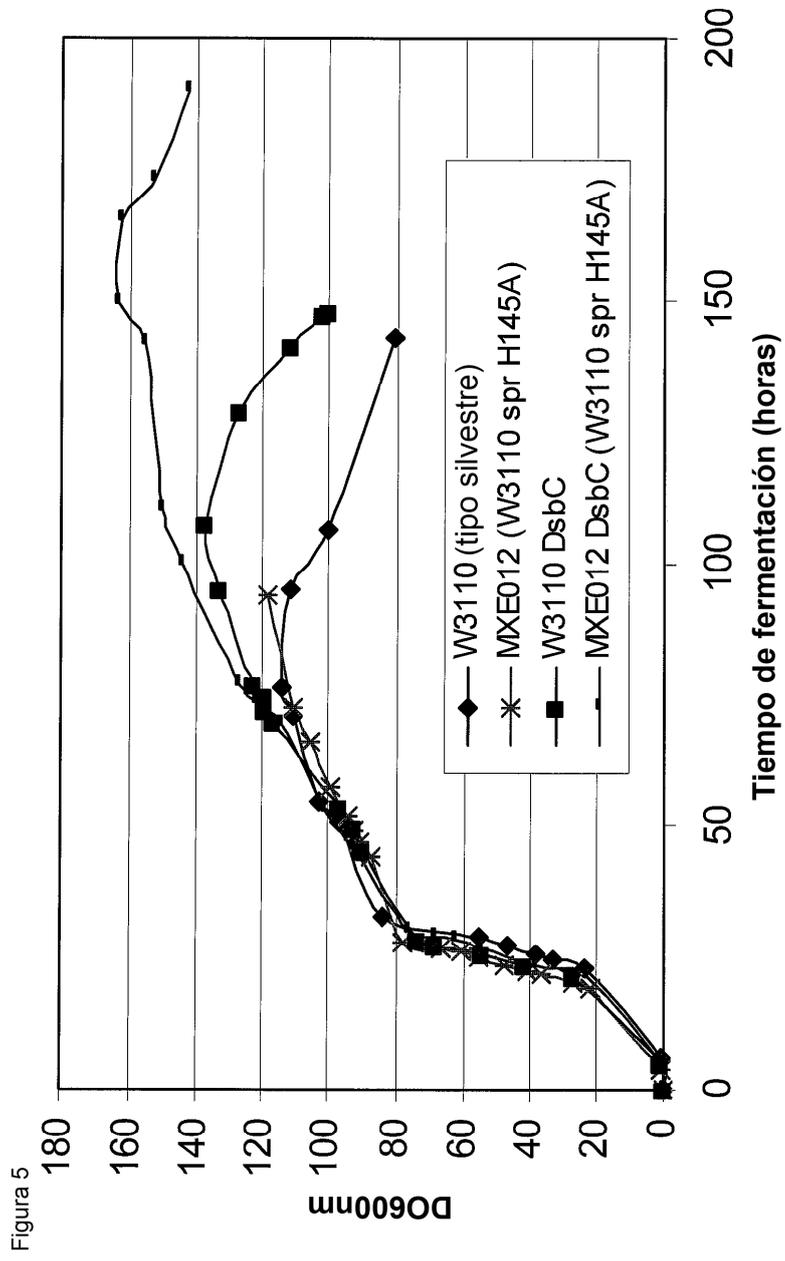


Figura 6

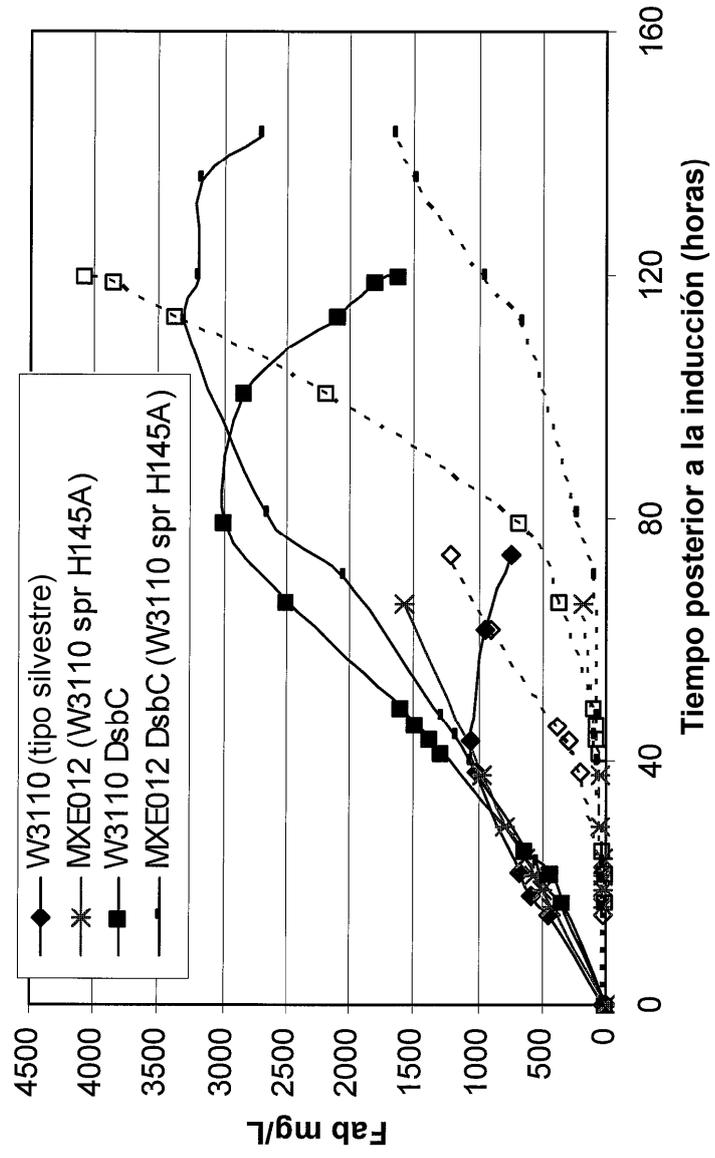


Figura 7

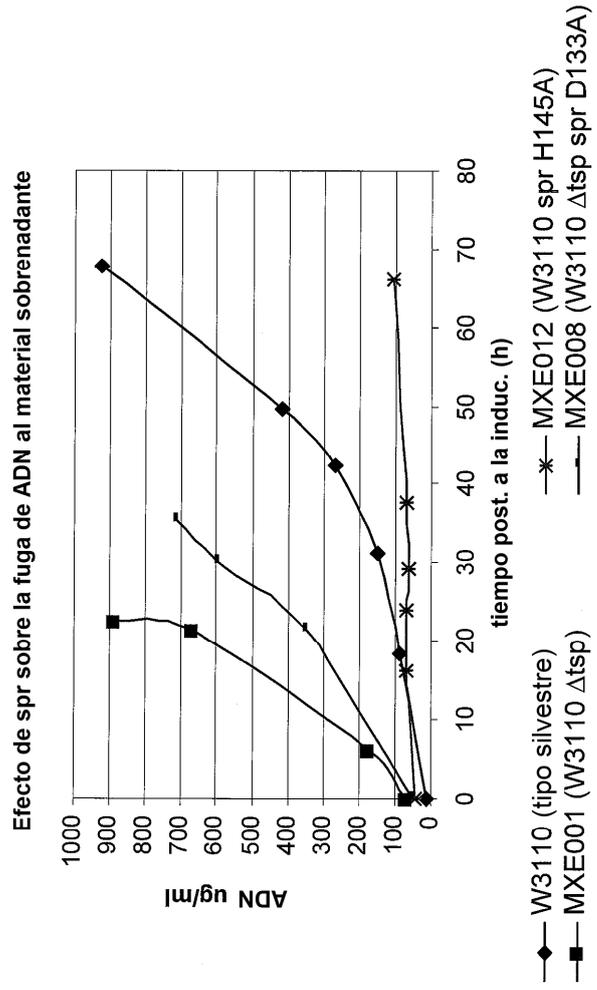


Figura 8

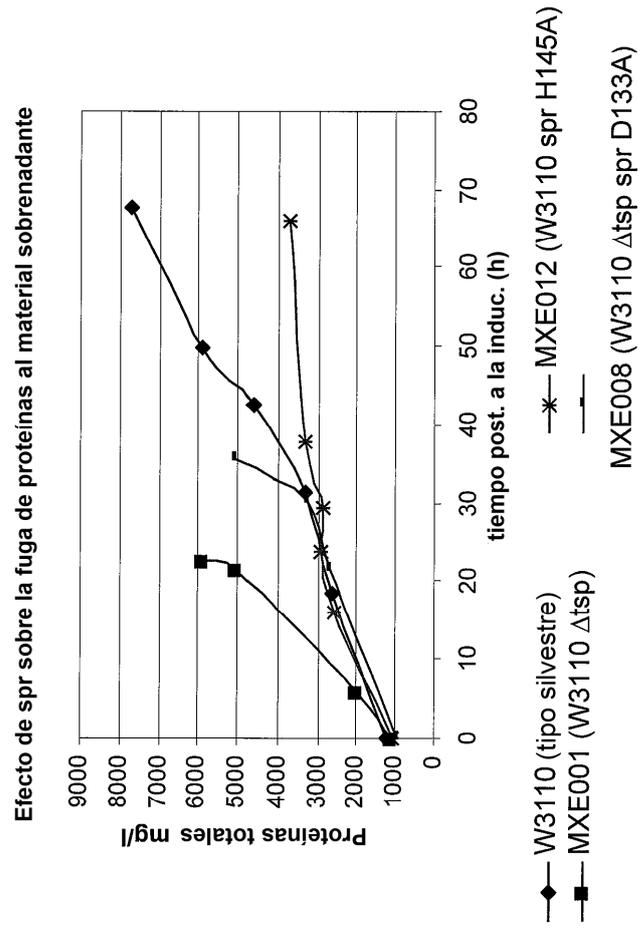


Figura 9a

ptr de tipo silvestre (proteasa III) 5'.

```

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

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

Δ ptr mutada (proteasa III) 5'.

```

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

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

Figura 9b

Tsp de tipo silvestre 5'.

```

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

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

ΔTsp mutada 5'.

```

EcoRI
~~~~~
M N S F L G L P R * L A C L Q
ATG AAT TCG TTT TTA GGC TTA CCG CGT TAG CTG GCC TGC TTG CAA

Ase I
~~~~~
* Q A R H * L
TAG CAG GCC AGA CAT TAA TTG
    
```

Figura 9c

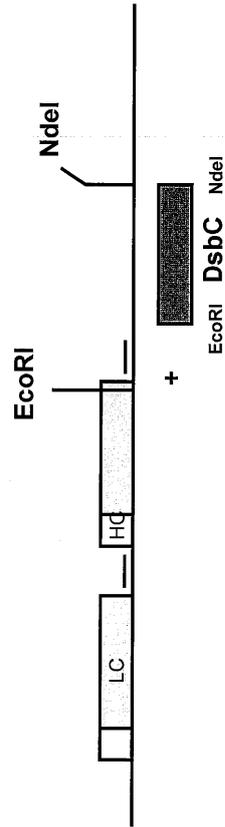
DegP de tipo silvestre

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

DegP mutada S210A

202 D A A I ^{*Ase I*} N R G N A G G

Figura 10



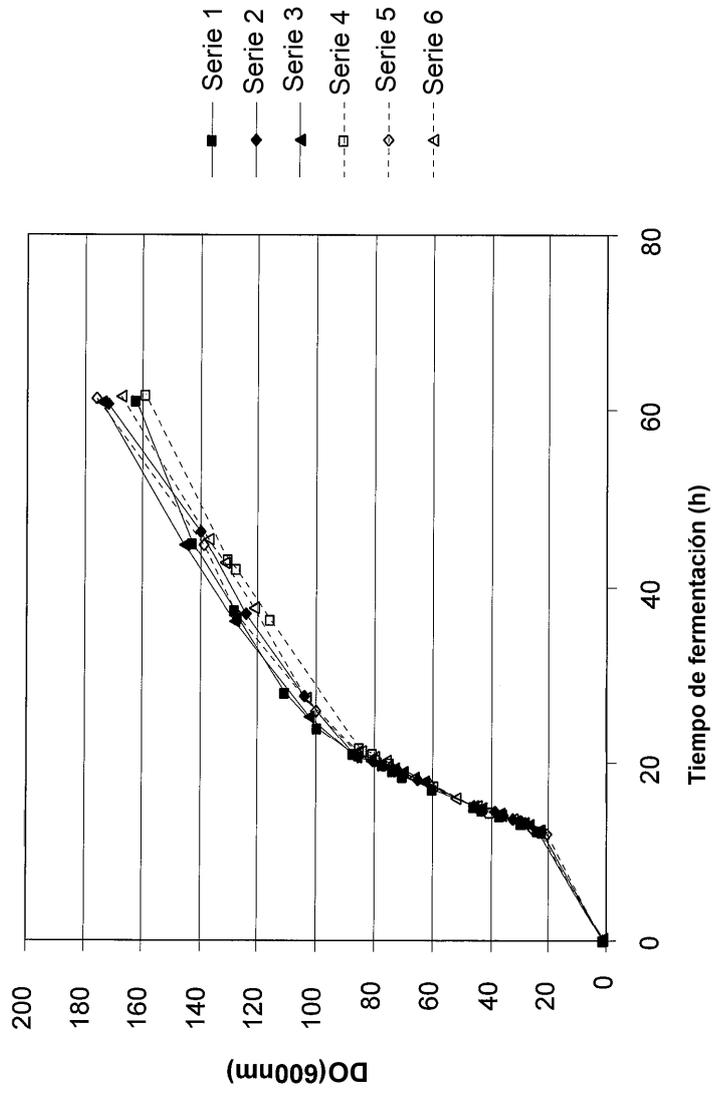


Figura 11

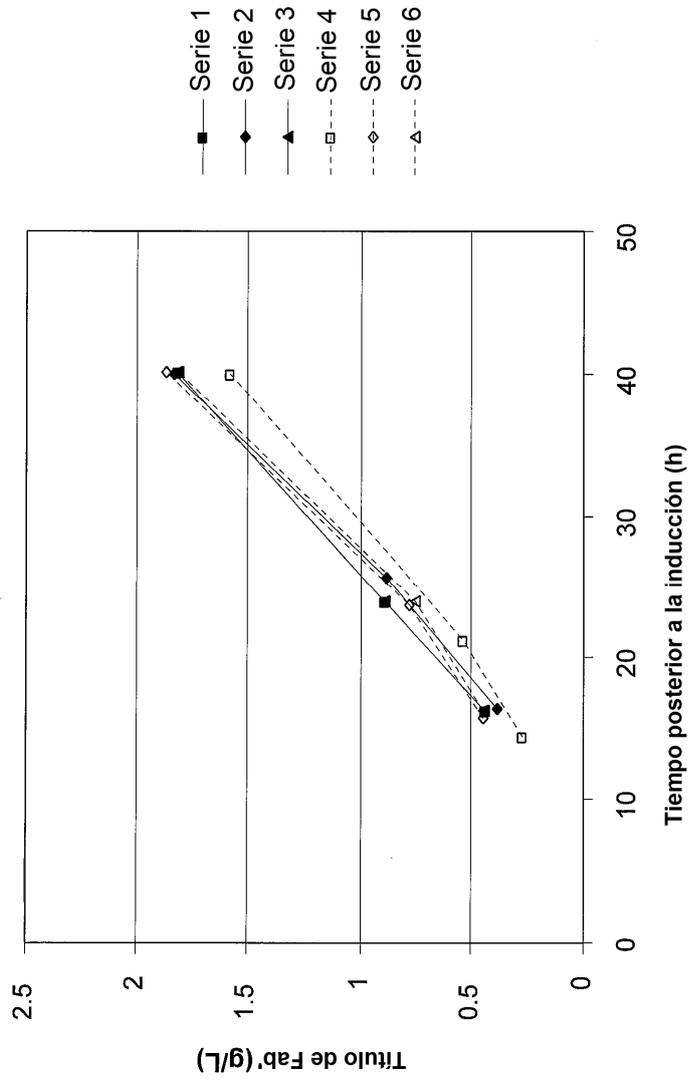


Figura 12

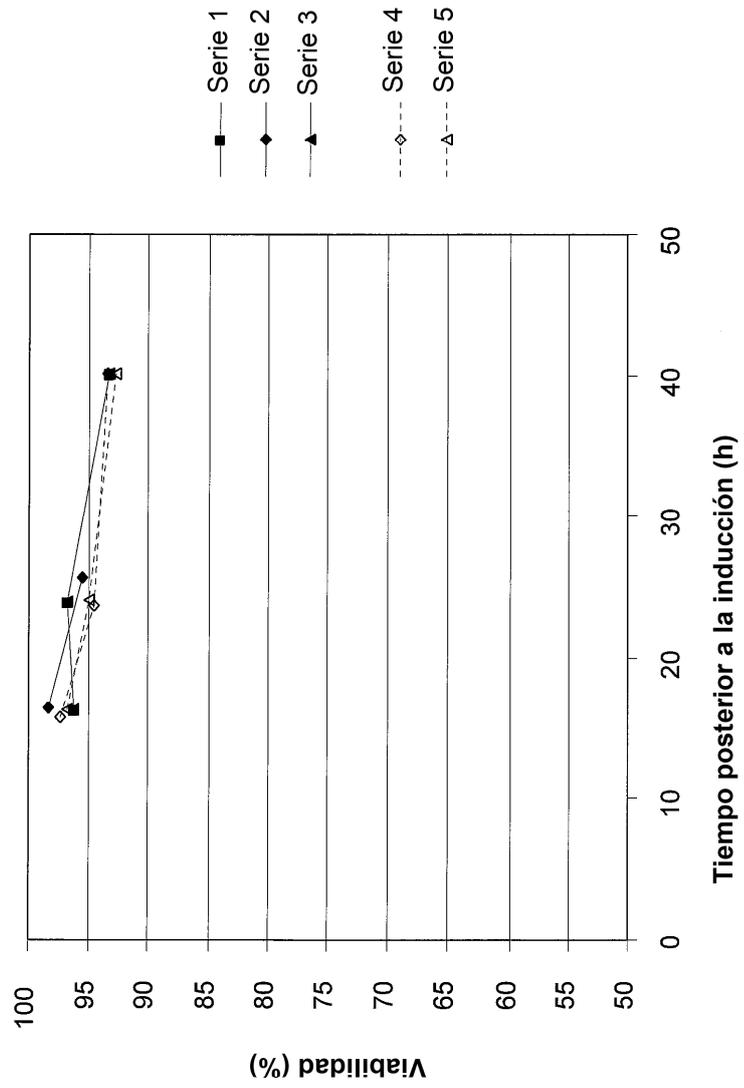


Figura 13

