

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 906**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2015 PCT/IB2015/055189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015 E 15745247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3167065**

54 Título: **Sistema de expresión bacteriano cistrónico doble**

30 Prioridad:

09.07.2014 IN 2245MU2014

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**LUPIN LIMITED (100.0%)
Kalpataru Inspire, 3rd Floor, Off Western Express
Highway, Santacruz (East)
Mumbai 400 055, IN**

72 Inventor/es:

**SALUNKHE, SHARDUL;
VARSHNEY, BRAJESH y
SOORAPANENI, SUDHEERBABU**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 808 906 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

Sistema de expresión bacteriano cistrónico doble

5 Campo de la invención

En el presente documento se describe un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector para la producción de una proteína de interés que comprende fragmentos Fab de anticuerpos recombinantes u otros fragmentos de anticuerpos, péptidos y proteínas expresados como cuerpos de inclusión insolubles formados en la bacteria *E. coli*.

10 La presente invención proporciona un procedimiento para la expresión de un anticuerpo o un fragmento del mismo utilizando dicho vector bicistrónico.

Antecedentes de la invención

15 La tecnología de ADN recombinante (ADNr) ha revolucionado la forma en que se preparan los agentes terapéuticos. Las proteínas necesarias se fabrican ahora dentro de una célula extraña y se purifican.

20 Las proteínas que tienen modificaciones postraduccionales (las MPT) generalmente se expresan como moléculas recombinantes en sistemas de mamífero o de levadura. Los sistemas de expresión de levadura como *Pichia* y *Saccharomyces* están más cerca de los sistemas de mamífero en términos de las MPT, pero aún difieren en los tipos de glucosilaciones, como los glucanos con alto contenido en manosa en el caso de *Pichia*, lo que los hace inadecuados para la expresión de proteínas recombinantes para el uso humano.

25 Los anticuerpos monoclonales (los mAb), los anticuerpos, las proteínas de fusión, los fragmentos Fab de los mAb, se utilizan como agentes terapéuticos. La tecnología de ADNr utiliza vectores y sistemas de expresión especializados para la producción de proteínas terapéuticas. Los sistemas de expresión consisten principalmente en sistemas de expresión de bacterias, de levadura, de insecto o de mamífero. Inicialmente, la mayoría de las proteínas recombinantes se expresaban en el sistema de expresión bacteriana utilizando *E. coli* como hospedadora. Utilizar *E. coli* como hospedador de expresión presenta varias ventajas, tal como la facilidad de clonación, facilidad de expresión, plazos más cortos, períodos de incubación más cortos y rendimientos muy altos. Por lo tanto, las proteínas que no necesitan ninguna MPT pueden expresarse de forma segura en *E. coli*.

35 Los Fab, que son la parte del fragmento de unión a antígeno de los mAb, no necesitan expresarse en sistemas de mamífero ya que no contienen los sitios de glucosilación presentes en la porción Fc del anticuerpo. Por tanto, los Fab habitualmente se expresan en un sistema de *E. coli*. Durante los años 80 y 90, varios investigadores intentaron la expresión de Fab en *E. coli*. Plückthun A *et. al.*, 1990 Behring Inst. Mitt. (87):48-55 son algunos de los primeros investigadores que informaron la secreción de anticuerpos Fab a partir de *E. coli*. Williamson R.A. *et. al.*, 1991 Biochem J. 277 (Pt 2):561-3 informaron el uso de vectores del bacteriófago lambda para la expresión de moléculas Fab en un sistema de presentación en fagos en *E. coli*. para la producción de Fab, de anticuerpo bivalente o de fragmentos de anticuerpo quimérico en *E. coli*. Además, también se produjo el Fab en *E. coli* como cuerpos de inclusión mal plegados, y después se los replegó para obtener la molécula funcional y, de este modo, se obtuvo un aumento del 40 % en los rendimientos de anticuerpos.

45 La mayoría de los estudios mencionados anteriormente utilizaron un único promotor, es decir, *phoA*, para dirigir la expresión tanto de la cadena pesada como de la ligera. El sitio de unión al ribosoma (sur) presente entre las cadenas pesada y ligera dirige la transcripción y la traducción del segundo gen.

50 El documento US5648237 también utilizó una estrategia similar de promotor único (*phoA*) para expresar genes de Fab en *E. coli*, para obtener el producto secretado. El principal inconveniente de la estrategia anterior es que los niveles de expresión del segundo gen son habitualmente más bajos que los del primer gen, limitando así los rendimientos del Fab funcional.

55 La patente N.º WO03018771 divulga un procedimiento para la producción de un anticuerpo mediante dos unidades traduccionales distintas, que codifican respectivamente las cadenas ligera y pesada de dicho anticuerpo o fragmento, en donde ambas cadenas se expresan de manera secuencial, separando de este modo de forma específica la producción de las cadenas ligera y pesada, y permitiendo el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada.

60 La patente N.º EP1356052B1 divulga un método para producir anticuerpos completos en células procariontas. Hay una presencia de un primer promotor y un primer cistrón para producir la cadena ligera de inmunoglobulina y de un segundo promotor y un segundo cistrón para producir la cadena pesada de inmunoglobulina, en donde ambas cadenas se pliegan y ensamblan para formar una inmunoglobulina biológicamente activa.

65 El documento WO2003018771 divulga un procedimiento para la producción de un anticuerpo mediante dos unidades traduccionales distintas, que codifican respectivamente las cadenas ligera y pesada de dicho anticuerpo o fragmento, en donde ambas cadenas se expresan de manera secuencial, separando de este modo de forma específica la producción de las cadenas ligera y pesada, y permitiendo el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada.

Kim KJ *et al.* (Protein Science, 2004, 13:1698-1703) divulgan un sistema de vector bicistrónico de dos promotores para la producción de proteína en grandes cantidades y adecuado para un ensayo de cristalización extenso.

5 Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

10 En el presente documento se describe un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector para la producción de proteínas y péptidos recombinantes expresados como cuerpos de inclusión insolubles en células bacterianas.

15 Además, se describe un procedimiento de preparación de un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector que tiene dos promotores distintos para la producción de proteínas y péptidos recombinantes expresados como cuerpos de inclusión insolubles en células bacterianas.

20 Además, se describe un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector que tiene dos promotores distintos para la producción de fragmentos de anticuerpos expresados como cuerpos de inclusión insolubles en células bacterianas.

Además, se describe un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector que tiene dos promotores distintos para la producción de un fragmento de anticuerpos Fab recombinante, expresado como cuerpos de inclusión insolubles en células bacterianas.

25 Además, se describe un sistema de expresión independiente de doble cistrón en un único vector que tiene dos promotores distintos para la producción de péptidos recombinantes expresados como cuerpos de inclusión insolubles en células bacterianas.

30 El sistema de expresión cistrónico doble puede comprender:

- a) un primer cistrón que comprende un promotor unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés;
- b) un segundo cistrón que comprende un promotor unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés;

35 en donde el primer y segundo cistrones se sitúan en un único vector y expresan una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés como cuerpos de inclusión en las células bacterianas. Además, se describe un vector cistrónico doble que comprende un promotor unido operativamente a un sitio de clonación múltiple que contiene un gen de interés, un sitio de unión al ribosoma y un terminador.

40 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo o un fragmento utilizando un sistema de expresión cistrónico doble como se describe en las reivindicaciones.

45 Los detalles expuestos a continuación son solo de naturaleza ilustrativa y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Otras características, objetos y ventajas de las invenciones serán evidentes a partir de la descripción.

Breve descripción de las figuras adjuntas

- Figura 1; ilustra la fórmula del vector bicistrónico
- Figura 2; ilustra el mapa vectorial del clon pET21a-HC-LC
- Figura 3; ilustra el análisis por SDS PAGE de la fracción de sedimento insoluble del clon *E. coli* BL21A1 junto con controles y el producto de referencia
- Figura 4; ilustra el análisis por RP-HPLC (forma siglada de *reversed phase-high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa) de muestras de CI solubilizados, observándose picos de la CP y la CL en el clon en comparación con la molécula de Fab reducida
- Figura 5; ilustra las ejecuciones de HPLC para separar el pico de la cadena pesada de otras proteínas
- Figura 6; ilustra un aumento significativo de la expresión del clon SAK-Lira en la construcción cistrónica doble en comparación con el clon de cistrón único en la línea celular *E. coli* BL21 A1.
- Figura 7; ilustra el mapa vectorial de pBAD24M-LC

60 Descripción detallada de la invención

Definiciones:

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de interés" se refiere en el presente documento a cualquier polipéptido, incluyendo proteínas y péptidos usados en la industria bioterapéutica o con fines de diagnóstico

o investigación.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés" como se usa en el presente documento incluye un ADN que codifica un gen, preferentemente un gen heterólogo que expresa el polipéptido.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "proteína y péptido recombinante" se refieren a una proteína o péptido que se produce mediante la expresión de ADN recombinante dentro de células vivas.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "Fab" y "anticuerpo" se usan indistintamente debido a que el anticuerpo comprende dos partes, es decir, la región Fab y la Fc.

15 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ADN utilizada como vehículo para portar artificialmente material genético extraño a una célula bacteriana, donde puede replicarse y expresarse. Como se usa en el presente documento, el término "cistrón" se refiere a una sección de ADN que contiene el código genético de un único polipéptido y funciona como una unidad hereditaria.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión independiente de doble cistrón" se refiere a dos cistrones distintos que se utilizan para expresar dos proteínas iguales o distintas de forma independiente.

Como se usa en el presente documento, el término "igual" es intercambiable con idéntico o similar.

25 La expresión "sistema de expresión cistrónica doble" como se usa en el presente documento incluye una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido a expresar y secuencias que controlan su expresión, tal como un promotor y, opcionalmente, una secuencia potenciadora. El promotor está unido operativamente al gen a expresar, es decir, una unidad de transcripción, o está separado del mismo mediante ADN intercalado, tal como por ejemplo por la región 5' no traducida del gen heterólogo.

30 Preferentemente, el sistema de expresión está flanqueado por uno o más sitios de restricción adecuados, para permitir la inserción del casete de expresión en un vector y/o su escisión de un vector. Por lo tanto, el sistema de expresión divulgado puede utilizarse para la construcción de un vector de expresión, en particular de un vector de expresión bacteriana. Como se usa en el presente documento, el término "promotores" se refiere a una región reguladora de ADN que habitualmente se encuentra corriente arriba de un gen, proporcionando un punto de control para una transcripción génica regulada.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ADN, en particular de secuencias genéticas a expresar y las secuencias que controlan su expresión.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "péptidos pequeños" o "péptidos" se refiere a péptidos que varían de 2 a 10 kDa, utilizados en la industria bioterapéutica y con fines de diagnóstico e investigación, como Liraglutida, exanetida, PTH, etc.

La invención se refiere a un procedimiento como se describe en las reivindicaciones.

45 En el presente documento se describe un sistema de expresión cistrónico doble para la producción de una diversidad de proteínas recombinantes de interés. En determinada realización, el sistema de expresión cistrónico doble comprende dos cistrones que tienen un promotor unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés y un terminador.

50 En determinada divulgación, el sistema de expresión cistrónico doble comprende dos cistrones que expresan la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés que se colocan en un solo vector.

En una divulgación, el sistema de expresión cistrónico doble comprende;

- 55 a) un primer cistrón que comprende un promotor unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés;
b) un segundo cistrón que comprende un promotor unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés;

60 en donde el primer y segundo cistrones se sitúan en un único vector y expresan una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés como cuerpos de inclusión formados en la célula hospedadora.

65 En una divulgación, el promotor puede seleccionarse de promotor de T7, promotor de arabinosa phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, trp, trc, preferentemente el promotor de T7 y el promotor de arabinosa. En determinada realización, el sistema de expresión cistrónico doble comprende dos cistrones que expresan la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés bajo el control de dos promotores. En una realización, ambos promotores controlan la expresión

de una secuencia polinucleotídica que codifica la misma proteína de interés. En otra realización, ambos promotores controlan la expresión de la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés, con una longitud de aminoácidos o propiedades fisicoquímicas distintas.

5 En determinada realización, la proteína de interés puede seleccionarse de péptidos y proteínas.

En alguna realización, las proteínas pueden expresarse en un vector bicistrónico. La proteína comprende un anticuerpo o fragmento del mismo. El fragmento de anticuerpo puede expresarse en el sistema de expresión bicistrónico. El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse de cadenas pesadas y ligeras de Fab de anticuerpos u otros fragmentos de anticuerpos, tales como scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, Bis-scFv, minicuerpos Fab₂ (bienespecíficos), Fab3 (triespecífico). En una realización preferente, el sistema de expresión bicistrónico expresa la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo que forman un anticuerpo Fab. En tal realización, el anticuerpo Fab muestra afinidad para el receptor de VEGF y dicho anticuerpo Fab es Ranibizumab.

15 En otra divulgación, la proteína puede seleccionarse de, pero sin limitación, G-CSF, IFN, eritropoyetina, insulina y sus variantes, PTH (aa 1-84), FSH, LH, GH y proteína disulfuro isomerasa (PDI).

En una divulgación, los péptidos pueden expresarse en vector bicistrónico. Los péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos que se selecciona de al menos, de menos de 40 aminoácidos o preferentemente menos de 31 aminoácidos, o más preferentemente menos de 10 aminoácidos. En determinada realización, el peso molecular del péptido se selecciona de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 kDa. El péptido puede seleccionarse de, pero sin limitación, análogos de péptido GLP-1 tales como Liraglutida o péptido Exendina, o de péptido GLP-2 como teduglutida y PTH (aa 1-34) e insulina. En otra realización preferente, el sistema de expresión bicistrónico expresa una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido agonista de GLP-1. En tal realización, el péptido GLP-1 es Liraglutida.

En otra realización, ambos promotores controlan independientemente la expresión de una cadena pesada o una cadena ligera de anticuerpo que tienen distintas longitudes de aminoácidos y propiedades fisicoquímicas.

30 En una divulgación, el sistema de expresión cistrónico doble comprende:

- a) el primer cistrón comprende el promotor de T7 unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena pesada de anticuerpo;
- b) el segundo cistrón comprende el promotor de arabinosa unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena ligera de anticuerpo;

En donde el primer y segundo cistrones se colocan en un único vector y expresan la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo como cuerpos de inclusión formados en la célula hospedadora.

40 En tal realización, la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo comprenden la secuencia de nucleótidos de la secuencia de n.º de ID 1 y la secuencia de n.º de ID 2, o la secuencia de aminoácidos de la secuencia de n.º de ID 3 y la secuencia de número de ID 4. En algunas realizaciones, la posición del primer y segundo cistrones es intercambiable, en donde el segundo cistrón puede clonarse en el vector en la posición del primer cistrón y el primer cistrón puede posicionarse en el segundo cistrón. La cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se expresan independientemente como cuerpos de inclusión y pueden tratarse adicionalmente para obtener anticuerpo Fab que muestre afinidad para el receptor de VEGF y dicho anticuerpo Fab es Ranibizumab.

50 En determinada realización, la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo se expresan, opcionalmente, en combinación con un péptido señal, preferentemente pelB. El péptido señal dirige la expresión de la proteína en el espacio periplásmico de la célula hospedadora.

55 En una realización, el sistema de expresión cistrónico doble en un único vector que tiene dos promotores distintos, los promotores de arabinosa y de T7 que regulan la producción de, respectivamente, las cadenas ligera y pesada de fragmentos Fab recombinantes, respectivamente, y que tienen ambos una etiqueta pelB, se producen como cuerpos de inclusión insolubles en el espacio periplásmico de *E. coli*.

60 En determinada realización, la cadena pesada o la cadena ligera de anticuerpo se expresan, opcionalmente, en combinación con un regulador, preferentemente el gen AraC, para aumentar adicionalmente la expresión de la proteína.

65 El sistema de expresión cistrónico doble proporciona la expresión equimolar de la proteína de interés. La expresión equimolar es muy conveniente para obtener la proteína de interés con una calidad y cantidad adecuadas. Depende de la relación de la cadena pesada y ligera o de la relación de la subunidad del polipéptido clonado en el vector. En determinada realización, la cadena pesada y la cadena ligera se clonan en una relación adecuada que comprende que la cadena pesada sea al menos igual o mayor que la cadena ligera, para obtener la expresión equimolar de la cadena pesada y la ligera. La cadena pesada y la cadena ligera se clonan en una relación seleccionada de 1:5:0,7 a

1:1, que incluye 1:3:0,8, 1:2:0,9, 1:2:1 1:1.

En una realización, el sistema de expresión cistrónico doble comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en la secuencia de n.º de ID 19.

5 En otra divulgación, el sistema de expresión cistrónico doble que comprende:

a) el primer cistrón comprende el promotor de T7 unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido;

10 b) el segundo cistrón comprende el promotor de arabinosa unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido;

en donde el primer y segundo cistrones se sitúan en un único vector y expresan el péptido como cuerpos de inclusión formados en la célula hospedadora.

15 En tal divulgación, el péptido es un análogo de GLP-1 que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en la secuencia de n.º de ID 6 que codifica el péptido agonista de GLP-1, que es Liraglutida que tiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de n.º de ID 7.

20 En determinada realización, el péptido puede expresarse, opcionalmente, con un péptido señal o regulador/potenciador conocido por el experto.

En determinada divulgación, el péptido puede expresarse, opcionalmente, con un compañero de fusión o una etiqueta de fusión para evitar la degradación del péptido. El compañero de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de 30 aminoácidos a 300 aminoácidos. El compañero de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de aproximadamente de 50 aminoácidos, 100 aminoácidos, aproximadamente 136 aminoácidos, aproximadamente 175 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 136 aminoácidos. La etiqueta de fusión puede seleccionarse de, pero sin limitación, etiqueta de histidina, glutatión-s-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, NusA, tiorredoxina (TRX), polihistidina (HIS), pequeño modificador similar a ubiquitina (SUMO, forma siglada de *small ubiquitin-like modifier*) y el gen de la ubiquitina (Ub) y la estafiloquinasa (SAK). En una realización preferente, la etiqueta de fusión es el gen de la SAK. El uso detallado del gen de la SAK como etiqueta de fusión con una proteína de interés se divulga en el documento US8853380.

35 En alguna realización, el sistema de expresión bicistrónico comprende adicionalmente un marcador de selección que se selecciona de ampicilina, kanamicina, preferentemente ampicilina.

En otra divulgación, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una proteína de interés que comprende las etapas de:

40 (i) transformar la célula hospedadora con un único vector que consiste esencialmente en un sistema de expresión cistrónico doble;

(ii) cultivar la célula transformada en un medio adecuado para expresar la proteína de interés, en donde el primer y el segundo cistrón expresan la proteína de interés en cuerpos de inclusión;

45 (iii) realizar la solubilización de los cuerpos de inclusión;

(iv) realizar el repliegamiento de la proteína de interés.

En una divulgación, el sistema de expresión bicistrónico se transfecta en la célula hospedadora bacteriana adecuada para expresar la proteína de interés. La célula hospedadora bacteriana adecuada es *E. coli*, en la que la proteína de interés se expresa en forma de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son la sustancia insoluble formada en el periplasma o citoplasma de *E. coli*. Los cuerpos de inclusión pueden aislarse, solubilizarse y las proteínas de interés pueden recuperarse en forma activa mediante las técnicas bien conocidas en la técnica.

En una realización, las cadenas pesadas y ligeras de los Fab de los anticuerpos u otros fragmentos de anticuerpos tales como scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, Bis-scFv, minicuerpos Fab₂ (biespecíficos), Fab3 (triespecífico), se expresaron como cuerpos de inclusión insolubles en el espacio periplásmico de *E. coli* mediante la construcción de dos cistrones independientes en un único vector que tiene dos promotores distintos, los promotores de arabinosa y de T7. Los dos promotores distintos, es decir, el promotor de T7 y el promotor de arabinosa, ayudaron en la expresión de las cadenas pesada y ligera de la molécula del Fab, respectivamente. Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se produjeron como cuerpos de inclusión no funcionales en la célula bacteriana, es decir, *E. coli*, las que posteriormente se extraen, repliegan y purifican.

En una realización de la invención, el cistrón comprende como tal que cada gen (cadena pesada y ligera) tenga sus propio promotor y terminador en un único vector. La cadena pesada se clonó bajo el control del promotor de T7 mientras que la cadena ligera se clonó bajo el control del promotor de arabinosa. Ambas cadenas estaban precedidas por la etiqueta pelB de secuencia señal, para obtener el producto en el espacio periplásmico de la membrana

bacteriana.

La ventaja del sistema de expresión bicistrónico es que tanto el de arabinosa como el de T7 son fuertes promotores, se obtiene una elevada expresión de las cadenas ligera y pesada a partir de un solo procedimiento de fermentación en lugar de fermentaciones separadas con clones de la cadena ligera y la pesada. El sistema de expresión de doble cistrón simplifica la caracterización y el mantenimiento de un banco de células único en lugar de bancos de células separados para los clones de la cadena ligera y la pesada. Además, los cuerpos de inclusión así obtenidos son relativamente puros cuando se extraen del espacio periplásmico de las células bacterianas. El alto nivel de expresión y las formas mucho más puras de las cadenas ligera y pesada obtenidas como cuerpos de inclusión son relativamente más fáciles de plegar en Fab funcionales *ex vivo*, aumentando significativamente, de este modo, el rendimiento del producto.

Otra ventaja del sistema es que una proteína de interés puede clonarse y expresarse bajo los promotores de arabinosa y de T7, y el nivel de expresión de la proteína puede aumentarse significativamente.

Los ejemplos divulgados a continuación son solo con fines ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: Clonación de la cadena pesada en el vector pET21a

La secuencia de ADN utilizada para la clonación de la cadena pesada y la ligera de fragmentos Fab se proporciona en las secuencias de n.º de ID 1 y 2, respectivamente. El inserto de la cadena pesada se amplificó a partir de ADN sintético utilizando cebadores específicos de genes. Los cebadores se diseñan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Después, el producto de PCR de la cadena pesada se digirió con las enzimas *NdeI-HindIII* y se ligó al vector pET21a digerido con las mismas enzimas. Los clones se exploraron mediante PCR de colonias y se confirmaron mediante análisis de restricción. El clon resultante se designó pET21a-HC. El vector recombinante se introdujo en la línea celular BL21A1 y se verificó la expresión de la cadena pesada.

Ejemplo 2: Clonación de la cadena ligera en el vector pBAD24M

El inserto de la cadena ligera se amplificó a partir de ADN sintético utilizando cebadores específicos del gen. Los cebadores están diseñados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. La cadena ligera amplificada se digirió con las enzimas *NdeI-HindIII* y se ligó al vector pBAD24M digerido (disponible en el laboratorio) en los mismos sitios. Los clones se exploraron mediante PCR de colonias y se confirmaron mediante análisis de restricción. El clon resultante se designó pBAD24M-LC. El vector recombinante se introdujo en la línea celular BL21A1 y se verificó la expresión de la cadena ligera.

Ejemplo 3: Construcción de dos cistrones independientes en el mismo vector

Los cebadores se diseñaron para amplificar la cadena ligera junto con el promotor de arabinosa, un terminador y el gen *araC*. Los cebadores están diseñados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Los cebadores añadieron un enlazador de *BglII* al producto amplificado. El vector pET21a tenía un único sitio *BglII* corriente arriba del promotor de T7. El casete de expresión de la cadena ligera se amplificó a partir del pBAD24M como molde con los cebadores específicos para el vector, y se clonó en el clon pET21a-HC en el sitio *BglII*. El clon se confirmó mediante digestión de restricción y secuenciación. El clon final se designó pET21a-HC-LC y el clon adecuado se seleccionó basándose en la expresión. El mapa de clon de pET21a-HC-LC se presenta en la Figura 2.

El clon así generado contiene todos los segmentos necesarios para la regulación independiente y la expresión de las cadenas pesada y ligera.

Ejemplo 4: Análisis de expresión

La línea celular *E. coli* BL21 A1 se utilizó como hospedador de expresión. Aparte de BL21 A1, se utiliza BL21 DE3 o cualquier otra línea celular que contenga el promotor de T7 en el genoma. Las células BL21 A1 se transformaron utilizando el clon seleccionado anteriormente junto con pET21a-HC y pBAD24M-LC como controles. La cadena pesada se indujo mediante IPTG al tiempo que la cadena ligera se indujo mediante arabinosa. La concentración del inductor fue de arabinosa 13 mM e IPTG 1 mM, y la inducción se realizó cuando la DO_{600} del cultivo fue de ~ 1 . Las células se recogieron 4 horas posinducción. El estudio se realizó en matraces de agitación. El material recogido obtenido se lisó con perlas y se centrifugó para separar las fracciones soluble e insoluble. Las muestras se cargaron en geles de SDS PAGE al 12 % para verificar la expresión. El análisis por gel SDS PAGE se muestra en la Figura 3. Se cargó ranibizumab reducido en el Carril 5 de la Figura 3 para confirmar la expresión de las cadenas ligeras y pesadas reducidas.

El análisis por SDS PAGE demostró la expresión de ambas cadenas en la fracción de sedimento insoluble y la misma se confirmó mediante análisis por RP-HPLC, en donde los tiempos de retención de las cadenas ligera y pesada del producto de referencia correspondieron a los tiempos de retención del producto propio. Los controles utilizados fueron la molécula Fab reducida (producto de referencia) y los productos del clon pET21a-HC y el clon pBAD24M. Por lo

tanto, se confirmó la expresión tanto de la cadena pesada y como de la ligera a partir de un único clon. El análisis por RP-HPLC se muestra en las Figura 4 y 5. En la RP-HPLC, los CI solubilizados y reducidos del clon de cistrón doble se compararon con ranibizumab reducido (RMP) y clones que expresan por separado las cadenas pesada y ligera, es decir, pET21-HC y pBAD24MLC.

5 El tiempo de retención (TR) del pico principal de CI solubilizados de pBAD24MLC, que expresa solo la cadena ligera, coincide con el TR de la cadena ligera de RMP reducida. Un pico de impurezas a TR de 13 minutos coincide con el tiempo de retención de la cadena pesada, lo que fue indicativo de una hidrofobicidad similar. Las impurezas, por lo tanto, se caracterizaron por LC-MS/MS (forma siglada de *liquid chromatography with mass spectrometry*, cromatografía líquida con espectrometría de masas) y finalmente se anotaron como proteína de la célula hospedadora OMP C y cadena ligera con secuencia líder sin escindir a TR de 17 minutos. La cadena pesada expresada por pET21a-HC coincide con la cadena pesada patrón de referencia. El perfil también indicó un pico posterior a TR de 19 minutos que se caracterizó como la cadena pesada con secuencia líder sin escindir. El clon cistrónico doble pET21a_HC_LC, que expresa tanto la CL como la CP, tiene 2 picos principales que tienen tiempos de retención equivalentes a los de la CL y la CP del patrón de referencia. Pero, dado que OMP C coeluyó con la cadena pesada, el método de análisis de fase inversa tuvo que resolverse mejor y esto se presenta en la Fig. 4.

El método existente en la columna Zorbax C8 RP se modificó a Aeriswidepore C8, y se resolvieron las especies que coelúan. Los CI solubilizados de pET21a_HC_LC presentaron en Aeriswidepore C8 picos distintos de CL, CP y OMP C, lo que permitió la identidad y la cuantificación precisa de subunidades individuales en los CI, como es evidente en la Figura 5.

Aunque determinadas realizaciones y ejemplos se han descrito en detalle anteriormente, los expertos en la materia entenderán claramente que son posibles muchas modificaciones en las realizaciones y ejemplos sin apartarse de las enseñanzas de los mismos.

Ejemplo n.º 5: Clonación de un péptido pequeño (Liraglutida) con la etiqueta de fusión de estafiloquinasa (SAK) en el vector pET24a

30 Los genes de la SAK y la Liraglutida se amplificaron a partir de ADN sintético utilizando cebadores específicos de los genes. Los cebadores se diseñan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y los productos de PCR se digirieron con las enzimas *NdeI-BamHI* y *BamHI-HindIII*, y se ligaron al vector pET24a digerido en los sitios *NdeI-HindIII*. Los clones se exploraron mediante PCR de colonias y se confirmaron mediante análisis de restricción. El clon resultante se designó pET24a-SAK-Lira.

Ejemplo 6: Clonación de un péptido pequeño (Liraglutida) con la etiqueta de fusión de estafiloquinasa en el vector pBAD24M

40 Como se proporciona en el ejemplo n.º 6, la Liraglutida con etiqueta de SAK se clonó en el vector pBAD24M. El clon se designó pBAD24M-SAK-Lira.

Ejemplo n.º 7: Construcción de dos cistrones independientes en el mismo vector, expresando ambos cistrones el péptido de fusión SAK-Lira

45 Para construir el clon de cistrón doble de Liraglutida se utilizó la estrategia de diseño de clones utilizada en el ejemplo n.º 3, en donde el gen de fusión de SAK-Lira junto con el casete de expresión de la arabinosa se amplificó a partir del clon pBAD24M-SAK-Lira, y se clonó en el clon pET24a-SAK-Lira para construir una construcción de cistrón doble. El clon se etiquetó como pET-ara-SAK-Lira

50 Ejemplo n.º 8: Análisis de expresión del clon de cistrón doble con la proteína de fusión de SAK-Lira.

La línea celular *E. coli* BL21 A1 se utilizó como hospedador de expresión. Aparte de BL21 A1, se utiliza BL21 DE3 o cualquier otra línea celular que contenga el promotor de T7 en el genoma. Las células BL21 A1 se transformaron utilizando las construcciones de cistrón simple y doble anteriores. Los clones se indujeron mediante IPTG y arabinosa. La concentración del inductor fue de arabinosa 13 mM e IPTG 1 mM, y la inducción se realizó cuando la DO₆₀₀ del cultivo fue de ~ 1. Las células se recogieron 4 horas posinducción. El estudio se realizó en matraces de agitación. El material recogido obtenido se lisó con perlas y se centrifugó para separar las fracciones soluble e insoluble. Las muestras se cargaron en geles de SDS PAGE al 12 % para verificar la expresión.

60 El análisis por gel SDS PAGE muestra claramente una expresión aumentada de la proteína de fusión SAK-Lira en el clon de cistrón doble (Figura 6, calle 2), en comparación con el clon pET24a-SAK-Lira de cistrón único (Figura 6, calle 3).

LISTADO DE SECUENCIAS

65 <110> LUPIN LIMITED

ES 2 808 906 T3

<120> Sistema de expresión bacteriano cistrónico doble

<130> FPAA4613PCT

5 <150> 2245/MUM/2014
<151> 09-07-2014

<160> 19

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 762

15 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada de Ranibizumab

20 <400> 1

```

atgaaatacc tgctgccgac agctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgaag tccaactggg cgaatcgggt ggtggctctgg tccaaccggg tggctctctg      120
cgtctgtcgt gtgctgcctc gggctatgat tttaccatt atggtatgaa ctgggtccgt      180
caggccccgg gtaaaggtct ggaatgggtg ggctggatta atacctacac ggggtgaaccg      240
acctatgctg ccgattttaa acgtcgcttt acgttctctc tggacacctc gaagagcacg      300
gcatatctgc agatgaacag tctgcgcgcg gaagataccg ccgtgtatta ctgctcgaag      360
taccctgatt actatggcac gtcccactgg tattttgacg tttggggcca aggtaccctg      420
gtcaccgtga gcagcgcgag caccaaaggc ccgagcgtgt tcccgtggc cccgagttcc      480
aagtctacca gtggcggtag ggcagctctg ggttgtctgg ttaaagatta ttttccgaa      540
ccggttaccg tctcctggaa cagcggcgca ctgacctctg gtgtgcatac gttcccggct      600
gttctgcagt catcgggcct gtacagcctg agcagcgtgg ttaccgttcc gagttcctca      660
ctgggtacc aaacgtatat ctgcaacgtc aatcacaac cgagcaatac caaagtggac      720
aaaaaagtgg aaccgaaatc gtgtgataaa acgcatctgt aa                          762

```

25 <210> 2

<211> 711

<212> ADN

<213> artificial

<220>

30 <223> Cadena ligera de Ranibizumab: sec. de nt 2295-3005

<400> 2

```

atgaaatacc tgctgccgac agctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgaca ttcaactgac gcaaagtccg agcagcctga gcgcatccgt gggcgaccgt      120

```

ES 2 808 906 T3

```

gtgacgatta cctgttccgc aagccaagac atctctaact atctgaattg gtaccagcaa      180
aaaccgggca aggcaccgaa agtcctgatt tattttacca gctctctgca ttccggcggt      240
ccgtcacggt ttagcggctc tggtagtggc accgatttca ccctgacgat cagttccctg      300
cagccggaag actttgctac gtattactgc cagcaatata gcaccgtgcc gtggacgttc      360
ggtcagggca ccaaggttga aattaaacgt acggttgagg ccccgctctgt ctttatcttc      420
ccgccgagtg atgaacagct gaaatcgggt accgcaagcg tggtttgtct gctgaacaat      480
ttctatccgc gcgaagcaaa ggtccagtgg aaagtggaca acgctctgca gtccggcaat      540
tcacaagaat cggtgaccga acaagatagc aaggactcta cgtacagtct gtcacgacc      600
ctgacgctgt ccaaagcgga ttatgaaaaa cacaaggttt acgcctgcga agtcacccat      660
caaggtctgt cgtctccggt taccaagagt ttcaatcgtg gcgaatgtta a              711

```

<210> 3
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ranibizumab

10

<400> 3

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1                    5                      10                15

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

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

Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50                    55                60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 65                    70                75                80

Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
                85                    90                95

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser
          115                    120                125

```

ES 2 808 906 T3

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
245 250

5 <210> 4
<211> 236
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ranibizumab

<400> 4

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

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

15

ES 2 808 906 T3

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

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

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

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

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

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

<210> 5
 <211> 762
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Complementaria de la cadena pesada de 940-178

10

<400> 5

ES 2 808 906 T3

ttacagatgc gttttatcac acgatttcgg ttccactttt ttgtccactt tggatttgc 60
 cggtttgtga ttgacgttgc agatatacgt ttgggtaccc agtgaggaac tcggaacggt 120
 aaccacgctg ctgaggctgt acaggcccga tgactgcaga acagccggga acgtatgcac 180
 accagaggtc agtgcgccgc tgttccagga gacggtaacc ggttccggaa aataatcttt 240
 aaccagacaa cccagagctg ccgtaccgcc actggtagac ttggaactcg gggccagcgg 300
 gaacacgctc gggcctttgg tgctcgcgct gctcacggtg accagggtac cttggcccca 360
 aacgtcaaaa taccagtggg acgtgccata gtaatacggg tacttgcgca agtaatacac 420
 ggcggtatct tccgcgcgca gactgttcat ctgcagatat gccgtgctct tcgaggtgtc 480
 cagagagaac gtaaagcgac gtttaaaatc ggccgcatag gtcggttcac ccgtgtaggt 540
 attaatccag cccaccatt ccagacctt acccggggcc tgacggacc agttcatacc 600
 ataatgggta aatcatagc ccgaggcagc acacgacaga cgcagagagc caccgggtg 660
 gaccagacca ccaccgatt cgaccagttg gacttcggcc atcggcggct gggcagcgag 720
 gagcagcaga ccagcagcag ctgtcggcag caggtatttc at 762

5 <210> 6
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de Liraglutida
 <400> 6

catgcagaag gcacctttac gaggatgtg agctcttatc tggaaggcca ggcggccaaa 60
 gaatttattg cgtggctggt tcgtggccgt ggttaa 96

15 <210> 7
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de Liraglutida
 <400> 7

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

25 <210> 8

ES 2 808 906 T3

<211> 456
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de SAK (con sitio EK)

<400> 8

catatgtcaa gttcattcga caaaggaaaa tataaaaaag gcgatgacgc gagttatfff	60
gaaccaacag gcccgatfff gatggtaaaf gtgactggag ttgatggtaa aggaaatgaa	120
ttgctatccc ctcatatgt cgagtttctt attaaacctg ggactacact taaaaagaa	180
aaaattgaat acctgcagga tgatgatgat aaatacgtag aatgggcatt agatgcgaca	240
gcatataaag agtttagagt agttgaatta gatccaagcg caaagatcga agtcacttat	300
tatgataaga ataagaaaa agaagaaacg aagtctttcc ctataacaga aaaaggffff	360
gttgtcccag atttatcaga gcatattaa aaccctggat tcaacttaat taaaaggff	420
gttatagaaa agaaaggatc cgatgatgat gataaa	456

10

<210> 9
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de SAK (con etiqueta de EK)

20

<400> 9

ES 2 808 906 T3

Met Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
 1 5 10 15

Ser Tyr Phe Glu Pro Thr Gly Pro Tyr Leu Met Val Asn Val Thr Gly
 20 25 30

Val Asp Gly Lys Gly Asn Glu Leu Leu Ser Pro His Tyr Val Glu Phe
 35 40 45

Pro Ile Lys Pro Gly Thr Thr Leu Thr Lys Glu Lys Ile Glu Tyr Leu
 50 55 60

Gln Asp Asp Asp Asp Lys Tyr Val Glu Trp Ala Leu Asp Ala Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Lys Glu Phe Arg Val Val Glu Leu Asp Pro Ser Ala Lys Ile Glu
 85 90 95

Val Thr Tyr Tyr Asp Lys Asn Lys Lys Lys Glu Glu Thr Lys Ser Phe
 100 105 110

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

Lys Asn Pro Gly Phe Asn Leu Ile Thr Lys Val Val Ile Glu Lys Lys
 130 135 140

Gly Ser Asp Asp Asp Asp Lys
 145 150

5 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Promotor de T7: 1011-1027

<400> 10
 ctatagtgag tcgtatt 17

15 <210> 11
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Terminador de T7: 26-72

<400> 11
 ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggtta gaggcccaa ggggtatgc ta 52

25 <210> 12
 <211> 10

ES 2 808 906 T3

<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> SUR de pET21a: 947-957

<400> 12
tctccttct 10

10 <210> 13
<211> 879
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> Gen AraC: 1048-1927

<400> 13

ttatgacaac ttgacggcta catcattcac tttttcttca caaccggcac ggaactogct 60

cgggctggcc ccggtgcatt ttttaaatac ccgcgagaaa tagagttgat cgtcaaaacc 120

aacattgcga ccgacggtgg cgataggcat ccgggtggtg ctcaaaagca gcttcgctg 180

gctgatacgt tggcctcgc gccagcttaa gacgctaata cctaactgct ggcggaaaag 240

atgtgacaga ccgacggcg acaagcaaac atgctgtgcg acgctggcga tatcaaaatt 300

gctgtctgcc aggtgatcgc tgatgtactg acaagcctcg cgtacccgat tatccatcgg 360

tggatggagc gactcgtaa tcgcttccat gcgccgcagt aacaattgct caagcagatt 420

tatcgccagc agctccgaat agcgccttc cccttgcccg gcgtaata tttgcccaaa 480

caggtcgctg aatgcggct ggtgcgcttc atccgggcga aagaaccccg tattggcaaa 540

tattgacggc cagttaagcc attcatgcca gtaggcgcgc ggacgaaagt aaaccactg 600

gtgataccat tcgcgagcct ccggatgacg accgtagtga tgaatctctc ctggcgggaa 660

cagcaaaata tcaccggtc ggcaaacaaa ttctcgtccc tgatTTTTca ccaccctg 720

accgcgaatg gtgagattga gaatataacc tttcattccc agcggtcggt cgataaaaaa 780

atcgagataa ccgttggcct caatcggcgt taaaccgcc accagatggg cattaacga 840

20 gtatcccggc agcaggggat cttttgcbc ttcagccat 879

<210> 14
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

25 <220>
<223> Promotor de arabinosa: 2203-2230

30 <400> 14
acgctttta tcgcaactct ctactgt 27

<210> 15
<211> 425
<212> ADN

35

ES 2 808 906 T3

<213> artificial
 <220>
 <223> Terminador de arabinosa: 3011-3438
 5 <400> 15
 gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgatata gattaaatca gaacgcagaa 60
 gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtccca cctgacccca 120
 tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga 180
 gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt 240
 cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg 300
 gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga gggtagcggg caggacgcc gccataaact 360
 gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa 420
 actct 425
 10 <210> 16
 <211> 1084
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de Lacl: 3810-4890
 <400> 16
 tgtgaaacca gtaacgttat acgatgtcgc agagtatgcc ggtgtctctt atcagaccgt 60
 ttcccgcgtg gtgaaccagg ccagccacgt ttctgcgaaa acgcgggaaa aagtggaagc 120
 ggcgatggcg gagctgaatt acattcccaa ccgcgtggca caacaactgg cgggcaaaca 180
 20 gtcgttgctg attggcgttg ccacctccag tctggccctg cacgcgccgt cgcaaattgt 240

ES 2 808 906 T3

cgcggcgatt aaatctcgcg ccgatcaact gggtgccagc gtggtggtgt cgatggtaga 300
 acgaagcggc gtcgaagcct gtaaagcggc ggtgcacaat cttctcgcg aacgcgtcag 360
 tgggctgacg attaactatc cgctggatga ccaggatgcc attgctgtgg aagctgcctg 420
 cactaatggt ccggcggttat ttcttgatgt ctctgaccag acacccatca acagtattat 480
 tttctcccat gaagacggta cgcgactggg cgtggagcat ctggtcgcg tgggtcacca 540
 gcaaactcgc ctgtagcgg gccattaag ttctgtctcg gcgcgtctgc gtctggctgg 600
 ctggcataaa tatctcactc gcaatcaaat tcagccgata gcggaacggg aaggcgactg 660
 gagtgccatg tccggttttc aacaaacct gcaaatgctg aatgagggca tcgttcccac 720
 tgcgatgctg gttgccaacg atcagatggc gctgggcgca atgcgcgcca ttaccgagtc 780
 cgggctgcgc gttggtgcgg atatctcggt agtgggatac gacgataccg aagacagctc 840
 atgttatatc ccgccgtaa ccaccatcaa acaggathtt cgctgctgg ggcaaaccag 900
 cgtggaccgc ttgctgcaac tctctcaggg ccaggcgggtg aagggaatc agctgttgcc 960
 cgtctcactg gtgaaaagaa aaaccacct ggcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg 1020
 cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca 1080
 gtga 1084

5 <210> 17
 <211> 861
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> bla (resistencia a ampicilina): 7085-7942
 <400> 17

ES 2 808 906 T3

```

ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatffc gttcatccat      60
agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc      120
cagtgcctgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa      180
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca      240
gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa      300
cgttggtgcc attgctgcag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt      360
cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc      420
ggttagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcaact      480
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc      540
tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg      600
ctcttgcccg gcgtaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct      660
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc      720
cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag      780
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac      840
acggaaatgt tgaatactca t                                             861

```

5 <210> 18
 <211> 1
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de origen de pBR322 en 6323

<400> 18
 t 1

15 <210> 19
 <211> 8540
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de clon completa del vector de cistrón doble que incluye el fab de cadena pesada y ligera

<400> 19

ES 2 808 906 T3

atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccogttaa gaggcccaa	60
ggggttatgc tagttattgc tcagcggggtg cagcagccaa ctcagottcc tttcgggctt	120
tgtagcagc cggatctcag tgggtggggt ggtgggtgctc gagtgccggcc gcaagctttt	180
acagatgcgt tttatcacac gatttcgggt ccactttttt gtccactttg gtattgctcg	240
gtttgtgatt gacgttgca atatacgttt ggttaccag tgaggaactc ggaacggtaa	300
ccacgctgct caggctgtac aggcccgatg actgcagaac agccgggaac gtatgcacac	360
cagaggtcag tgcgccgctg ttccaggaga cggtaaccgg ttccggaaaa taatctttaa	420
ccagacaacc cagagctgcc gtaccgccac tggtagactt ggaactcggg gccagcggga	480
acacgctcgg gcctttgggtg ctgcgctgc tcacgggtgac cagggtacct tggcccaaaa	540
cgtcaaaaata ccagtgggac gtgccatagt aatacgggta cttcgcgcag taatacacgg	600
cggtatcttc cgcgcgcaga ctgttcatct gcagatatgc cgtgctcttc gaggtgtcca	660
gagagaacgt aaagcgacgt ttaaaatcgg ccgcataggt cggttcacc gtgtaggtat	720
taatccagcc caccattcc agaccttac ccggggcctg acggaccag ttcataccat	780
aatgggtaaa atcatagccc gaggcagcac acgacagacg cagagagcca cccggttggg	840
ccagaccacc acccgattcg accagttgga cttcggccat cggcggctgg gcagcgagga	900
gcagcagacc agcagcagct gtcggcagca ggtatttcat atgtatatct ccttcttaa	960
gttaaacaaa attatttcta gaggggaatt gttatccgct cacaattccc ctatagtgag	1020

ES 2 808 906 T3

tcgtattaat ttcgcgggat cgagatcttt atgacaactt gacggctaca tcattcactt 1080
 tttcttcaca accggcacgg aactcgcctg ggtggcccc ggtgcatttt ttaaataccc 1140
 gcgagaaata gagttgatcg tcaaaaccaa cattgcgacc gacggtggcg ataggcatcc 1200
 ggggtggtgct caaaagcagc ttcgcctggc tgatacgttg gtcctcgcgc cagcttaaga 1260
 cgtaatccc taactgctgg cggaaaagat gtgacagacg cgacggcgac aagcaaacat 1320
 gctgtgcgac gctggcgata tcaaaattgc tgtctgccag gtgatcgcctg atgtactgac 1380
 aagcctcgcg tacccgatta tccatcggtg gatggagcga ctcgtaatc gcttccatgc 1440
 gccgcagtaa caattgctca agcagattta tcgccagcag ctccgaatag cgcccttccc 1500
 cttgcccggc gttaatgatt tgcccaaaca ggtcgcctgaa atgcggtggg tgcgcttcat 1560
 ccgggcgaaa gaaccccgta ttggcaaata ttgacggcca gttaagccat tcatgccagt 1620
 aggcgcgcgg acgaaagtaa acccactggt gataccattc gcgagcctcc ggatgacgac 1680
 cgtagtgatg aatctctcct ggcggaaca gcaaaatata acccggtcgg caaacaatt 1740
 ctcgctccctg atttttcacc acccctgac cgcgaatggt gagattgaga atataacctt 1800
 tcattcccag cggtcggtcg ataaaaaat cgagataacc gttggcctca atcggcgta 1860
 aacccgccac cagatgggca ttaaacgagt atccggcgag caggggatca ttttgcgctt 1920
 cagccatact tttcatactc ccgccattca gagaagaaac caattgtcca tattgcatca 1980
 gacattgccg tcaactgcgtc ttttactggc tcttctcgtt aaccaaacgg gtaaccccg 2040
 ttattaaaag cattctgtaa caaagcggga ccaaagccat gacaaaaacg cgtaacaaaa 2100
 gtgtctataa tcacggcaga aaagtccaca ttgattatth gcacggcgtc aacttttgc 2160
 atgccatagc atttttatcc ataagattag cggatcctac ctgacgcttt ttatcgcaac 2220
 tctctactgt ttctccatac ccgttttttt gggctagaaa taattttggt taactttaag 2280
 aaggagatat acatatgaaa tacctgctgc cgacagctgc tgctggtctg ctgctcctcg 2340
 ctgcccagcc ggcgatggcc gacattcaac tgacgcaaag tccgagcagc ctgagcgcac 2400
 ccgtgggcga ccgtgtgacg attacctgth ccgcaagcca agacatctct aactatctga 2460
 attggtacca gcaaaaaccg ggcaaggcac cgaaagtcct gatttattht accagctctc 2520
 tgcattccgg cgttccgtca cgttttagcg gctctggtag tggcaccgat ttcaccctga 2580
 cgatcagttc cctgcagccg gaagactttg ctacgtatta ctgccagcaa tacagcaccg 2640
 tgccgtggac gttcggtcag ggcaccaagy ttgaaattaa acgtacggtt gcggccccgt 2700
 ctgtctttat cttcccgcgg agtgatgaac agctgaaatc gggtagcgca agcgtggttt 2760
 gtctgctgaa caatttctat ccgcgcgaag caaaggtcca gtggaaagtg gacaacgctc 2820
 tgcagtccgg caattcacia gaatcgggtga ccgaacaaga tagcaaggac tctacgtaca 2880

ES 2 808 906 T3

gtctgtcatc gaccctgacg ctgtccaaag cggattatga aaaacacaag gtttacgcct 2940
 gcgaagtcac ccatcaaggt ctgtcgtctc cggttacca gagtttcaat cgtggcgaat 3000
 gttaaaagct tggctgtttt ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat 3060
 cagaacgcag aagcggctctg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc gcggtggtcc 3120
 cacctgacct catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt agtgtggggg 3180
 ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa 3240
 gactgggcct ttcgttttat ctggtgtttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat 3300
 ccgccgggag cggatttgaa cgttgcaag caacggcccg gaggtggcg ggcaggacgc 3360
 ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga tggccttttt 3420
 gcgtttctac aaactcttag atctcgatcc tctacgccgg acgcatcgtg gccggcatca 3480
 ccggcgccac aggtgcgggt gctggcgcct atatgccga catcaccgat ggggaagatc 3540
 gggctcgcca cttcgggctc atgagcgtt gtttcggcgt ggggatggtg gcaggccccg 3600
 tggccggggg actggtgggc gccatctcct tgcattgcacc attccttgcg gcggcggtgc 3660
 tcaacggcct caacctacta ctgggctgct tcctaataca ggagtcgcat aaggagagc 3720
 gtcgagatcc cggacacccat cgaatggcgc aaaaccttc gcggtatggc atgatagcgc 3780
 ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgtata cgatgtcgca 3840
 gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt 3900
 tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggaaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattccaac 3960
 cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag tcggtgctga ttggcgttgc cacctccagt 4020
 ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgct gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg 4080
 ggtgccagcg tgggtggtgct gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg 4140
 gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac 4200
 caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgct 4260
 tctgaccaga caccatcaa cagtattatt ttctccatg aagacggtac gcgactgggc 4320
 gtggagcatc tggctgcatt gggtcaccag caaatcgcgc tgtagcggg cccattaagt 4380
 tctgtctcgg cgcgtctcgc tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt 4440
 cagccgatag cggaaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg 4500
 caaatgctga atgagggcat cgttcccact gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg 4560
 ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggtg 4620
 gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc cgcctaac caccatcaa 4680
 caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc 4740
 caggcgggtg agggcaatca gctgttgccc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccaccctg 4800

ES 2 808 906 T3

gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 4860
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg taagttagct 4920
 cactcattag gcaccgggat ctcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcaagctc 4980
 ctcccggtgg gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat 5040
 gcaactcgtg ggacaggtgc cggcagcgcct ctgggtcatt ttcggcgagg accgctttcg 5100
 ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgct tgccgtattc ggaatcttgc acgccctcgc 5160
 tcaagccttc gtcactggtc ccgccacca acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc 5220
 cggcatggcg gccccacggg tgcgcatgat cgtgctcctg tcggtgagga cccggctagg 5280
 ctggcggggt tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg atacgcgagc gaacgtgaag 5340
 cgactgctgc tgcaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca tgaatggtct tcggtttccg 5400
 tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgcctcgc accattatgt tccggatctg 5460
 catcgcagga tgctgctggc taccctgtgg aacacctaca tctgtattaa cgaagcgtg 5520
 gcattgacc ctagtgattt ttctctggtc ccgccgcctc cataccgcca gttgtttacc 5580
 ctcaaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta acccgtatcg tgagcatcct 5640
 ctctcgtttc atcggtatca ttacccccat gaacagaaat ccccttaca cggaggcatc 5700
 agtgaccaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccgc tttatcagaa gccagacatt 5760
 aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca tctgtgaatc 5820
 gcttcacgac cacgctgatg agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 5880
 tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc 5940
 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt ggcgggtgtc ggggcgcagc 6000
 catgaccag tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcacagag 6060
 cagattgtac tgagagtgca ccatatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga 6120
 gaaaataccg catcagcgc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggctg 6180
 ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat 6240
 caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 6300
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaana 6360
 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 6420
 ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt 6480
 ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcaagctgt aggtatctca 6540
 gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc 6600
 accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa ccggtaaga cacgacttat 6660

ES 2 808 906 T3

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 6720
 cagagttcct gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 6780
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 6840
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgagaaaaa 6900
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaacgaaa 6960
 actcacgtta agggattttg gtcacgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 7020
 taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca 7080
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca 7140
 tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggaggggctta ccatctggcc 7200
 ccagtgcctgc aatgataccg cgagaccac gctcacccggc tccagattta tcagcaataa 7260
 accagccagc cgaaggggccc gagcgcagaa gtggctcctgc aactttatcc gcctccatcc 7320
 agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 7380
 acgttgctgc cattgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat 7440
 tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag 7500
 cggttagctc cttcggctcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 7560
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 7620
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt 7680
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 7740
 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat 7800
 ccagttcgat gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 7860
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga 7920
 cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 7980
 gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 8040
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgaaattgt aaacgttaat attttgtaa 8100
 aattcgcggt aaatttttgt taaatcagct cattttttta ccaataggcc gaaatcggca 8160
 aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agataggggt gagtgttggt ccagtttggg 8220
 acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 8280
 agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatacaag ttttttgggg tcgaggtgcc 8340
 gtaaagcact aaatcggaac cctaaagggg gcccccgatt tagagcttga cggggaaagc 8400
 cggcgaacgt ggcgagaaaag gaagggaaga aagcgaagg agcggggcgt agggcgctgg 8460
 caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgcttaat gcgccgctac 8520
 agggcgcgct ccattcgcca 8540

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende las etapas de:

- 5 (i) transformar una célula hospedadora bacteriana con un único vector que consiste en un sistema de expresión cistrónico doble;
(ii) cultivar las células bacterianas transformadas en medio adecuado para expresar el anticuerpo o un fragmento del mismo como cuerpos de inclusión;
10 (iii) realizar la solubilización de dichos cuerpos de inclusión;
(iv) realizar el replegamiento del anticuerpo o el fragmento del mismo;
en donde el sistema de expresión cistrónico doble comprende:

- 15 a) un primer cistrón que comprende un promotor de T7 unido operativamente con una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada del anticuerpo o el fragmento de la misma;
b) un segundo cistrón que comprende un promotor de arabinosa unido operativamente con una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma;

20 en donde el primer y segundo cistrones se sitúan en el vector único y expresan el anticuerpo o fragmento del mismo como cuerpos de inclusión; y
en donde la expresión de la cadena pesada se induce mediante IPTG, al tiempo que la expresión de la cadena ligera se induce mediante arabinosa, de tal manera que la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a niveles de expresión equimolares.

25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula hospedadora bacteriana es *E. coli*.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sistema de expresión cistrónico doble comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 19.

30 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el procedimiento es para la producción de Ranibizumab y comprende las etapas de:

- 35 (i) transformar *E. coli* con un único vector que consiste en el sistema de expresión cistrónico doble;
(ii) cultivar la célula transformada en un medio adecuado, en donde el primer y el segundo cistrón expresan las cadenas pesada y ligera de Ranibizumab como cuerpos de inclusión;
(iii) realizar la solubilización de dichos cuerpos de inclusión;
(iv) realizar el replegamiento de dichos cuerpos de inclusión en condiciones adecuadas para obtener un Ranibizumab funcional;

40 en donde el primer cistrón comprende un promotor de T7 unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena pesada de ranibizumab, y el segundo cistrón comprende un promotor de arabinosa unido operativamente con la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena ligera de ranibizumab; y
en donde se utiliza IPTG 1 mM para inducir la expresión de la cadena pesada de Ranibizumab al tiempo que se utiliza Arabinosa 13 mM para inducir la expresión de la cadena ligera de Ranibizumab, de tal manera que la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a niveles de expresión equimolares.

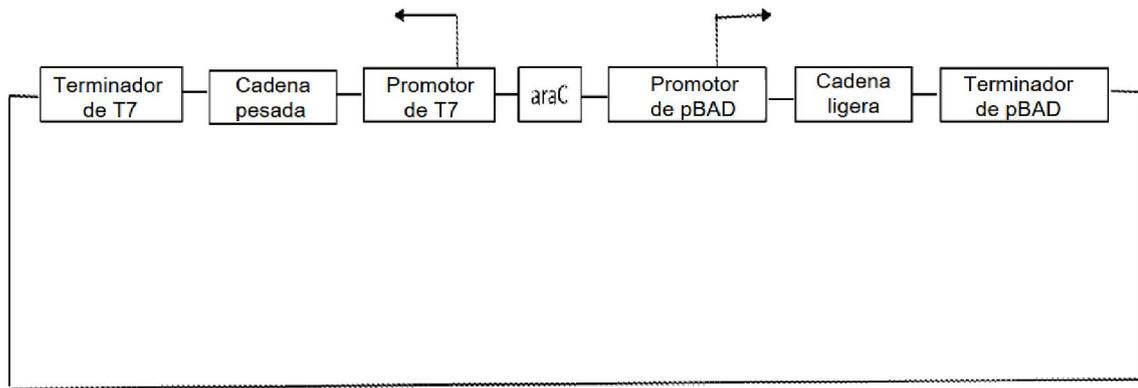


Figura 1

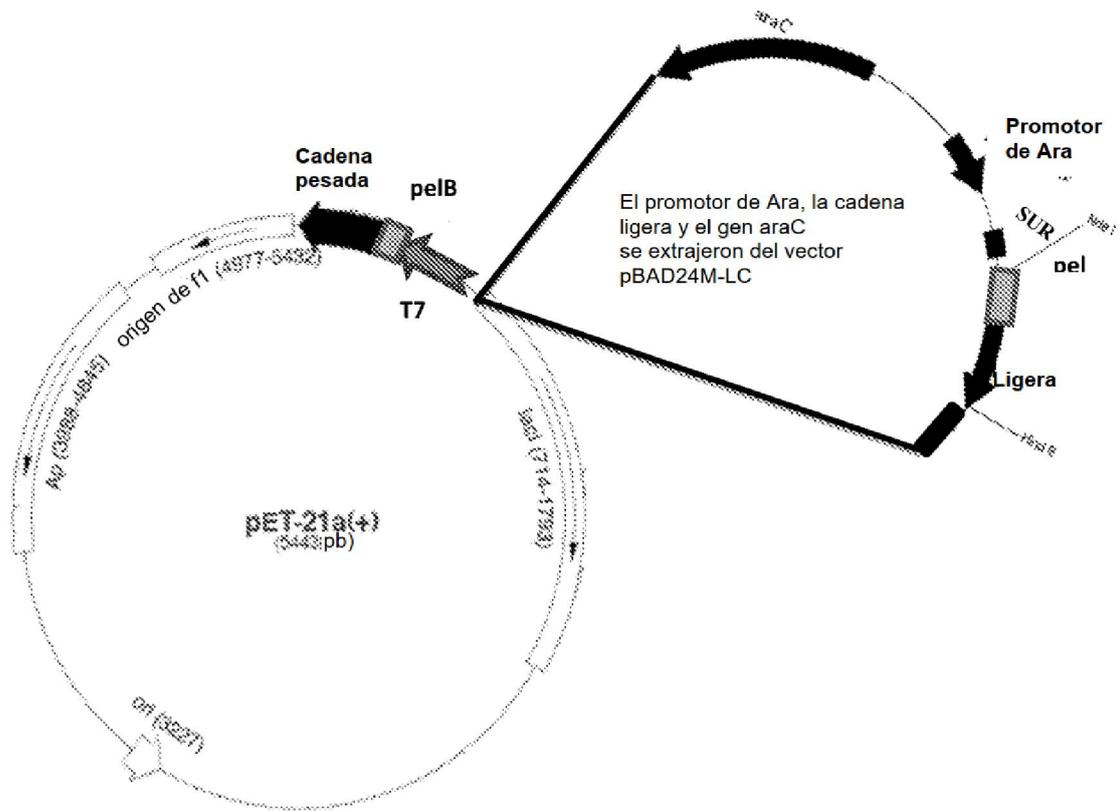
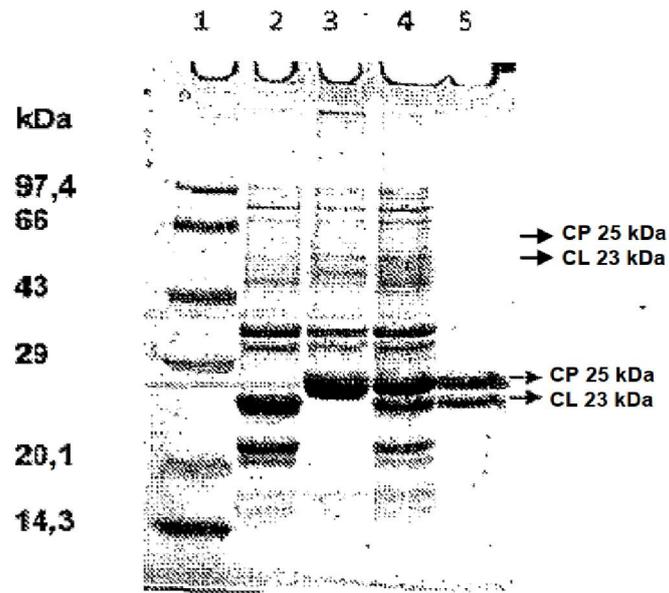


Figura 2



N.º de calle	Descripción de la calle
1	Marcador de peso molecular de proteínas
2	pBAD cadena ligera/BL21 A1
3	pET21a cadena pesada/BL21A1
4	Clon de cistrón doble pET21a-HC-LC/BL21 A1
5	Patrón de Ranibizumab

Figura 3

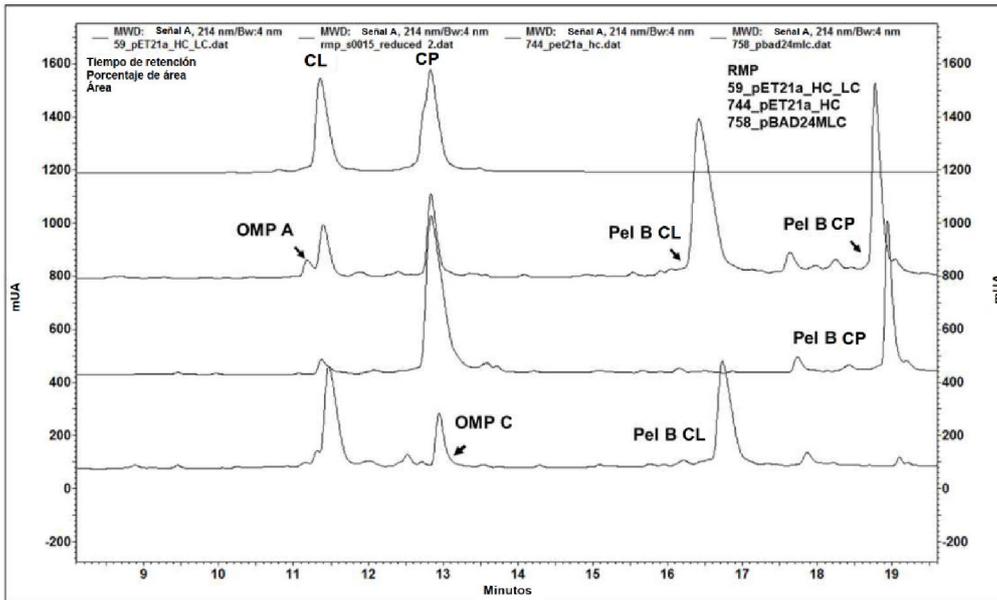


Figura 4

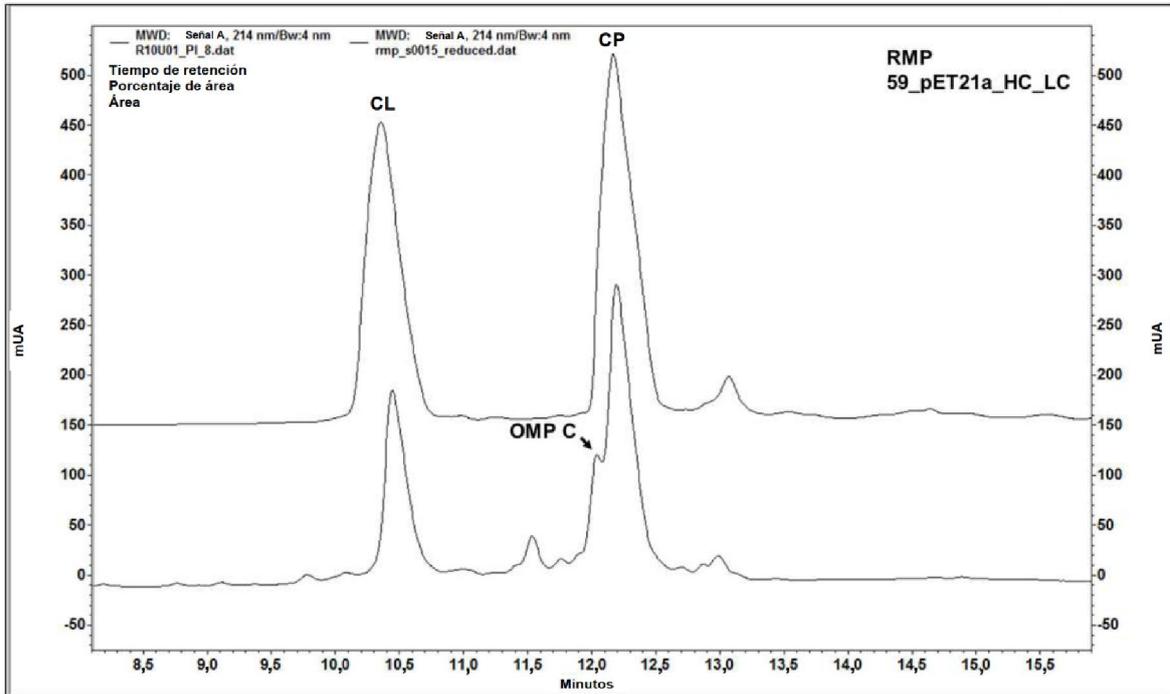
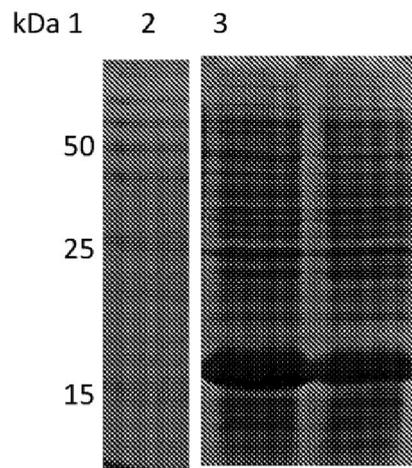


Figura 5



N.º de calle	Descripción de la calle
1	Marcador de peso molecular de proteínas
2	Clon de cistrón doble pET-ara-SAK-Lira/BL21 A1
3	Clon de cistrón único pET-SAK-Lira

Figura 6

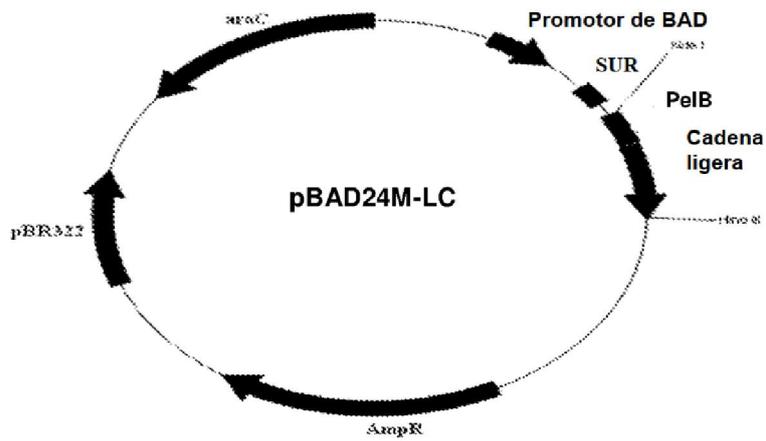


Figura 7