



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 141**

51 Int. Cl.:
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01972084 .6**
86 Fecha de presentación : **28.09.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1326989**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Vectores de expresión de origen de replicación ColE1 modificado para controlar el número de copias de plásmidos.**

30 Prioridad: **04.10.2000 EP 00121709**

73 Titular/es: **Boehringer Ingelheim Austria GmbH
Dr. Boehringer-Gasse 5-11
1120 Wien, AT**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

72 Inventor/es: **Bayer, Karl;
Grabherr, Reingard;
Nilsson, Erik y
Striedner, Gerald**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 286 141 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

Vectores de expresión de origen de replicación ColE1 modificado para controlar el número de copias de plásmidos.

5 La presente invención se refiere a vectores de expresión mejorados, que tienen un origen de sistema de replicación ColE1, para la producción de proteínas recombinantes y DNA plásmido.

El uso de procesos de fermentación con microorganismos modificados genéticamente (GMO) para la producción de proteínas recombinantes de interés o para la producción de DNA plásmido se ha generalizado en la industria.

10 Cuando se optimiza un proceso de fermentación, el principal objetivo consiste en obtener la mayor cantidad posible de producto, de buena calidad y por un método de costes bajos. Para conseguirlo se tiene que optimizar la productividad volumétrica, definida como unidades de producto formadas por volumen y tiempo. Los factores que tienen un gran impacto en el proceso de optimización son la biomasa por volumen, es decir, la cantidad de células capaces de producir el producto y la cantidad de proteína que cada célula puede producir. Hasta cierto límite, la capacidad de producción por célula es proporcional al número de copias de plásmidos (PCN), el número de plásmidos de la célula que llevan el código genético de la proteína recombinante. Es importante además la potencia del sistema de transcripción de la proteína recombinante. Algunos promotores son débiles y no sacan todo el provecho del potencial metabólico, mientras que otros promotores son excesivamente fuertes y conducen a la sobreexpresión de la proteína recombinante. Dado que los recursos metabólicos tienen que compartirse entre la expresión de la proteína recombinante y la proteína hospedante, un sistema de expresión que sea demasiado fuerte conducirá al agotamiento (depleción) de los recursos metabólicos, que se traduce en la muerte celular.

25 Recientemente, el uso de DNA plásmido en el ámbito de la terapia genética se ha convertido en el foco de una industria completamente nueva. Para ello se requieren cantidades suficientes de DNA plásmido de alta calidad. En los procesos de producción de plásmidos no se producen proteínas recombinantes, sino que la fábrica celular se explota para la producción de DNA plásmido. Son necesarios porcentajes de replicación de plásmidos extremadamente elevados para conseguir este objetivo, para ello la célula hospedante tiene que asumir funciones que difieren de la producción de proteínas recombinantes.

30 Para los procesos de fermentación bacteriana se ha sugerido el uso de plásmidos ColE1, principalmente porque los números elevados de copias de plásmidos que pueden obtenerse con este sistema.

35 Los plásmidos ColE1 se han descrito ampliamente con anterioridad (Chan y col., 1985) y se ha estudiado bien el mecanismo de replicación del origen ColE1 (Cesareni y col., 1991). La replicación a partir de un plásmido ColE1 se inicia con la transcripción del precebador RNAII, 555 bp en sentido ascendente (upstream) del origen de replicación, por la RNA-polimerasa del hospedante (Tomizawa, 1985). El RNAII se pliega en estructuras específicas durante la elongación y después de la polimerización de unos 550 nucleótidos empieza a formar un híbrido con el DNA molde. La transcripción del precebador termina de modo heterogéneo y después de la formación del híbrido el RNAII precebador se rompe por acción de la RNasa H, formando un cebador activo con un extremo 3'OH libre, que es accesible a la DNA-polimerasa I (Tomizawa, 1990; Lin-Chao y Cohen, 1991; Merlin y Polisky, 1995).

45 La región del ColE1 contiene dos promotores. El RNAI es una molécula de RNA antisentido de 108 nucleótidos, que se transcribe a partir del segundo promotor de la hebra opuesta y es complementario del extremo 5' del RNAII. El RNAI se transcribe a partir de 445 bp en sentido ascendente (upstream) del origen de replicación, del punto en el que arranca la transcripción del RNAII (Merlin y Polisky, 1995; Tomizawa, 1990).

50 Para la regulación del número de copias de plásmidos en los plásmidos ColE1, la cinética es más importante que las características de equilibrio. Por ejemplo, algunas cepas mutantes con mutaciones en el RNAII, aunque no influyen en las regiones complementarias del RNAI, dan lugar a una inhibición menor con el RNAI. Esto se debe probablemente al efecto de la vida media de las estructuras de RNA intermedio, que disminuyen el tiempo de susceptibilidad al RNAI y, de este modo, dan lugar a números más elevados de copias de plásmidos. Este hallazgo sugiere la importancia de las estructuras del RNAII intermedio y de la cinética del mecanismo de pliegue del RNAII (Gulyaev y col., 1995).

55 Se ha observado que la subalimentación de aminoácidos se traducen en cantidades grandes de tRNA, que no están cargados con el aminoácido específico (a continuación, estos tRNA se llamarán "tRNA no cargados"). Este fenómeno puede compararse con la situación del tiempo después de la inducción de la expresión de la proteína recombinante, en la que los recursos metabólicos se han agotado, tal como se ha explicado antes.

60 Wróbel y Wegrzyn (1998) han ensayado una estrategia de inducción selectiva de subalimentación de cinco aminoácidos diferentes. Se ha encontrado que existe una correlación positiva entre la homología de los bucles anticodón de los tRNA correspondientes a los aminoácidos concretos desposeídos y los bucles concretos del RNAI y RNAII. Se supone que la mayor parte de los tRNA cargados se han capturado por el mecanismo de la traducción, mientras que los tRNA no cargados tienen la oportunidad de interactuar con otras moléculas, el RNAI y el RNAII. La interacción entre el tRNA y el RNAI o el RNAII interferiría con gran probabilidad en la interacción entre el RNAI y el RNAII, resultando de ello una mayor frecuencia de hibridación entre RNAII y DNA (suponiendo que la interacción del tRNA con el RNAII no modifique la estructura del RNAII de modo drástico). La última implicaría una mayor frecuencia de replicación y, por tanto, un PCN más elevado.

ES 2 286 141 T3

Zavachev e Ivanov (1988) han comparado la homología entre todos los 21 tRNA y RNAI/RNAII. De estos, 11 presentan una homología superior al 40% con respecto al RNAI o al RNAII. Los dividieron en tres categorías: a) los tRNA homólogos del RNAI: Arg, His, Leu, Lys, Phe y Thr, b) los tRNA homólogos del RNAII: f-Met, Try y Gly y c) los tRNA homólogos tanto del RNAI como del RNAII: Met y Val. Todos los tRNA tienen bucles anticodón de 7 nucleótidos (Hjalt y Wagner, 1992). En el caso de los tRNA homólogos del RNAI, la homología más alta se encuentra en la región del bucle 2, al tiempo que la mayor parte presenta menos homología en el extremo 5' del RNAI.

La subalimentación y el estrés celular conducen a grupos mayores de tRNA no cargados, que interactúan con el origen de la replicación de los plásmidos ColE1. Esta interacción ocurre debido a la homología de secuencias de los tRNA con las estructuras de los tres bucles de RNA presentes en el RNAI y el RNAII del origen de replicación, que conduce a la interferencia con el mecanismo de control del PCN del sistema. Por tanto, el PCN aumenta rápidamente y provoca el colapso del proceso de fermentación.

Para superar estos problemas, en el documento WO 89/07141 se sugiere un vector de expresión que tiene un sistema de replicación de ColE1, que contiene una mutación en el gen RNAII y/o en el gen rop con el fin de aumentar la expresión. Esto se consigue sin aumentar sustancialmente el número de copias de plásmidos.

Dado que el proceso de fermentación bacteriana solamente es eficaz cuando el sistema se mantiene durante un período prolongado de tiempo y dado que un número elevado de copias de plásmidos es uno de los principales factores que provoca el colapso del sistema de expresión, un objeto de la invención consiste en proporcionar un sistema de expresión mejorado con un viabilidad bacteriana prolongada durante la fermentación.

Es un objeto de la invención en particular el proporcionar un sistema de expresión, en el que el número de copias de plásmidos, después de la inducción del sistema de expresión, es limitado por comparación con la amplificación incontrolada, con el fin de mantener la carga metabólica por debajo de las dosis letales.

Otro objeto de la invención consiste en aumentar los porcentajes de replicación de plásmidos y, de este modo, el rendimiento en DNA plásmido en los procesos de producción de plásmidos.

Para resolver el problema que subyace a la invención se utiliza el mecanismo de replicación del tipo ColE1.

En concreto se adopta una estrategia genética para alterar, con preferencia disminuir o abolir por completo el grado de homología del origen de replicación ColE1 con los tRNA no cargados. En una estrategia alternativa se crea una biblioteca aleatoria con el fin de seleccionar los plásmidos de comportamiento de replicación alterado, p.ej. un número alto de número de copias de plásmidos.

La presente invención se refiere a un vector de expresión que tiene un sistema de replicación ColE1, en el que la homología del RNAI y RNAII del origen de replicación ColE1 con los tRNA no cargado se modifica con una o más mutaciones de la región codificadora del gen del RNAI y una o más mutaciones correspondientes del gen RNAII, dicha(s) mutacion(es) producen uno o más intercambios de bases en el bucle 1 y/o en el bucle 2 y/o en el bucle 3 del RNAI y RNAII.

El término "mutación" abarca tanto las mutaciones que aumentan como las mutaciones que disminuyen la homología del RNAI y el RNAII con los tRNA no cargados.

Con el fin de mantener la estructura secundaria y la temperatura de fusión del RNAI y del RNAII en la medida de lo posible para no perjudicar la replicación, estas mutaciones son con preferencia intercambios de bases complementarias, es decir, mutaciones A→T, T→A, C→G, G→C. Pueden estar presentes también otra(s) mutacion(es), con la condición de que no perjudiquen el mecanismo de replicación.

A diferencia del vector ColE1 según WO 89/07141, que contiene una mutación en el gen RNAII y, debido a su posición, como consecuencia en el promotor del gen RNAI, el vector de la invención contiene una mutación en la región codificadora, más en concreto en las regiones de bucle tanto del gen RNAI como del RNAII, que son homólogos de los tRNA no cargados.

La presente invención proporciona por tanto una nueva estrategia de manipulación deliberada del grado de homología y a fin de cuentas de regulación del porcentaje de replicación de los plásmidos.

En el contexto de la presente invención, el término "bucle" abarca con preferencia la estructura del bucle no apareado del RNAI o del RNAII; sin embargo, este término no se limita estrictamente a la mera región del bucle, sino que abarca también a los nucleótidos adyacentes de la región troncal, con preferencia a un máximo de dos nucleótidos.

La o las mutaciones pueden ser un intercambio de una base en el bucle 1, bucle 2 o bucle 3 o intercambios de una base o de cualquier número de bases, incluidos los intercambios de todas las bases, en el bucle 1 y/o en el bucle 2 y/o en el bucle 3.

Con preferencia, la o las mutaciones se realizan en el bucle 2, que la región de homología más alta con los tRNA no cargados.

ES 2 286 141 T3

Las mutaciones deseadas en el o en los bucles del gel del RNAI y el RNAII pueden obtenerse con arreglo a técnicas convencionales de mutación y clonación.

5 En una forma de ejecución, estas mutaciones pueden obtenerse del modo siguiente: partiendo del gen de RNAI o del gen de RNAII o de un fragmento de los mismos como molde se efectúa una reacción PCR que emplea como cebadores a dos oligodesoxirribonucleótidos, uno o ambos llevan la o las mutaciones deseadas. La reacción PCR es con preferencia una PCR de dos pasos. En el primer paso se amplifican dos fragmentos solapados, uno de los cuales contiene la mutación deseada de la secuencia de cebador entre el sitio de restricción que se diseña para conectar los fragmentos y el sitio de fijación del cebador. A continuación se digieren los fragmentos amplificados con la enzima
10 relevante de restricción, se ligan y se utilizan como molde para el siguiente paso de amplificación PCR. En tal paso se emplean los mismos cebadores que en el primer paso, que no contienen el sitio de restricción recién introducido y que se han seleccionado para fijar en dirección ascendente (upstream) y descendente (downstream) de los sitios de restricción únicos más próximos del plásmido individual.

15 Debido a la complementariedad de los genes RNAI y RNAII, para la preparación del vector ambos genes o fragmentos de los mismos son igualmente idóneos como moldes para la amplificación PCR. Con la complementariedad existente cualquier mutación o mutaciones en uno o más bucles de uno de los genes se obtendrá la mutación correspondiente en el otro gen complementario; en el método preferido ya descrito antes, el cebador que contiene la o las mutaciones no sirve solamente para la elongación de la polimerasa, sino también como molde para la DNA-polimerasa,
20 proporcionando de este modo la hebra complementaria que contiene la o las mutaciones. Dependiendo de si se emplea el gen RNAI o RNAII como molde, el RNAII o el RNAI realizarán automáticamente la mutación complementaria.

Se emplea como molde con preferencia un plásmido que contenga el gen RNAI o el RNAII completos. Como alternativa puede utilizarse una molécula de DNA que codifique al gen de RNAI o RNAII completos. Los genes RNAI y RNAII se han descrito por Tomizawa y col., 1977.
25

En el caso, en que se emplee como molde un fragmento del gen de RNAI o RNAII, el fragmento deberá tener un tamaño suficiente para contener todos los elementos requeridos, es decir, la secuencia que se quiere mutar, el sitio de fijación del cebador y, opcionalmente, uno o más sitios de restricción. El fragmento contiene con preferencia
30 uno o más bucles (cada uno de ellos contiene aproximadamente 7 nucleótidos) y un sitio de fijación del cebador (aproximadamente 18 nucleótidos), es decir, el tamaño mínimo de un fragmento idóneo será de aproximadamente 25 - 30 nucleótidos.

En una forma preferida de ejecución de la invención, las mutaciones se eligen en término de sitio o sitios y número o números, con el fin de cambiar sustancialmente el grado de homología con respecto al mayor número posible de especies de tRNA no cargados.
35

Por tanto, en una forma de ejecución de la invención, la modificación del RNAI y RNAII se efectúa empezando con una modificación del bucle 2, es decir, el bucle que posee la homología más elevada, dicha modificación consiste en el intercambio de tantas posiciones como sea posible. A título de ejemplo, tal como se pone de manifiesto en el ensayo del ejemplo 1, el bucle 2 puede modificarse reemplazando seis de sus siete nucleótidos, dejando sin alterar una base (posición 693 del plásmido ColE1, Genbank GI 9507253) y haciendo de este modo que esté disponible como parte del sitio de restricción, con preferencia un sitio NcoI. Estas bases se reemplazan con sus bases complementarias respectivas.
40

45 Con esta estrategia, si se desea, puede abolirse por completo la homología con todos los tRNA no cargados. Por lo tanto, esta estrategia proporciona una flexibilidad máxima para la producción de una gran variedad de proteínas recombinantes de interés con independencia de su secuencia de aminoácidos, en particular mediante el control de la replicación de plásmidos, manteniendo la viabilidad celular durante la expresión. En este caso, la amplificación de los plásmidos está sometida solamente al control del mecanismo de replicación específico de la ColE1 y es independiente de las fluctuaciones metabólicas de la célula hospedante; en este caso, el número de copias de plásmidos se mantiene esencialmente constante a lo largo del proceso de fermentación.
50

55 Como alternativa a la abolición completa de la homología entre el RNAI y el RNAII y los tRNA no cargados, esta homología podría modificarse, es decir, aumentarse o disminuirse solamente en un cierto grado según se deseara. Para algunas aplicaciones, p.ej. si el rendimiento de producto es insuficiente debido a que no se explota por completo el potencial de la maquinaria de expresión debido al menor número de copias de plásmidos y la cantidad subóptima de plásmidos (“dosificación de genes”), puede ser deseable aumentar los porcentajes de expresión aumentando ligeramente el número de copias de plásmidos. Esto puede lograrse manteniendo selectivamente la homología de secuencia con algunos tRNA no cargados, en particular con los tRNA raros. Las homologías de secuencia de tRNA no cargados específicos se conoce por la bibliografía técnica (Zavachev e Ivanov, 1988). Esta estrategia puede ser también útil para influir en la relación de la síntesis de proteínas, por ejemplo que el producto esté presente en forma de cuerpos de inclusión o en forma soluble. A título de ejemplo, un cierto grado de amplificación de plásmidos puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que una ligera disminución puede favorecer la formación de un producto soluble.
60
65

Para algunas aplicaciones es ventajoso aumentar fuertemente el número de copias de plásmidos mediante el aumento de la homología de secuencia de RNAI y RNAII con respecto a los tRNA no cargados, en particular para la pro-

ES 2 286 141 T3

ducción del DNA plásmido. Las mutaciones requeridas para aumentar la homología de secuencia se conocen también por la bibliografía técnica (Zavachev e Ivanov, 1988) y pueden llevarse a cabo con arreglo a los mismos principios descritos para disminuir la homología de secuencias.

5 Para una aplicación y/o producto individual puede optimizarse el proceso mediante ensayos experimentales de una serie de mutaciones. Los ensayos adecuados pueden realizarse del modo siguiente: se transfecta un plásmido o una serie de candidatos de plásmidos que llevan una mutación o mutaciones a ensayar en células hospedantes bacterianas idóneas, se cultivan en condiciones apropiadas a pequeña escala, p.ej. en frascos de agitación y se hace el seguimiento del proceso de fermentación en lo referente a los parámetros de interés, en particular el crecimiento, el rendimiento de producto y su calidad, el número de copias de plásmidos.

10 Otra forma de ejecución, que es particularmente útil para obtener una amplia gama de modificaciones de secuencia, consiste en la mutación aleatoria de una o más posiciones del bucle 1 y/o del bucle 2 y/o del bucle 3, generando de este modo una biblioteca que puede utilizarse para la construcción de un vector de expresión elegido por cualquier propiedad deseada del sistema de expresión. A título de ejemplo, un candidato de plásmido puede elegirse debido a ciertos parámetros de selección que son los más relevantes para la producción de proteína recombinante, p.ej. velocidad de crecimiento, productividad y viabilidad; se lleva a cabo el proceso con un montaje experimental estándar, ya descrito anteriormente.

20 Además, esta estrategia permite un ajuste eficaz de la relación de expresión de la proteína recombinante basada en la manipulación del PCN. Con la condición de que el gen de interés esté presente en el vector que contiene la biblioteca, el plásmido elegido será siempre óptimo para la expresión del gen de interés.

25 Durante las fermentaciones normales se observa un aumento casi décuple del número de copias de plásmidos (PCN) después de la inducción, mientras que con arreglo a la presente invención disminuye o se suprime la homología entre los tRNA y el RNAII. Esto tiene el efecto que un grupo más amplio de moléculas de RNAI no inhibidas no necesita interactuar con el RNAII. Por consiguiente, el mecanismo de replicación se desliga de grandes grupos de tRNA no cargados debido a la sobrecarga metabólica causada por la expresión de proteína recombinante.

30 La separación de la replicación de plásmidos del estrés metabólico referido a la expresión de proteína recombinante produce un rendimiento más elevado en proteína recombinante.

35 Dado que los intercambios de bases según la presente invención están presentes tanto en el RNAI como en el RNAII, que conduce a un cambio de homología con respecto a todos los tRNA, la composición de los tRNA no cargados (dependiente del producto recombinante) no es relevante para esta estrategia.

40 Además del sistema de replicación modificado de ColE1, el vector de expresión de la invención contiene los elementos requeridos para la expresión de proteínas, es decir, las secuencias de control de expresión unidas operativamente a la secuencia del cDNA que codifica a la proteína de interés, incluidos el promotor, la región de inicio de traducción, los marcadores de selección (p.ej. marcadores de resistencia a antibióticos), los sitios de restricción para la inserción del DNA que codifica a la proteína de interés, etc.

El vector de expresión de la invención se deriva con preferencia de uno de los vectores siguientes:

45 pMB1 (Bolivar y col., 1977);

pBR322 (Covarrubias y col., 1981; suministrado por MBI Fermentas, número de catálogo: SD0041; GenBank/EMBL números de registro de secuencias: J01749, K00005, L08654, M10282, M10283, M10286, M10356, M10784, M10785, M10786, M33694, V01119);

50 pUC18 (Yanisch-Perron y col., 1985; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: L09137; suministrado por MBI Fermentas número de catálogo: SD0061);

55 pUC19 (GenBank/EMBL número de registro de secuencia: L09136; suministrado MBI Fermentas, número de catálogo: SD0051);

pTZ19R (GenBank/EMBL número de registro de secuencia: Y14835; suministrado por MBI Fermentas, número de catálogo: SD0141);

60 pTZ19U (suministrado por MBI Fermentas, número de catálogo: SD0161; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: Y14835);

pBluescriptII KS(-) (Alting-Mees y col., 1989; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: X52329);

65 pBluescriptII KS(+) (Alting-Mees y col., 1989; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: X52327);

pBluescriptII SK(-) (Alting-Mees y col., 1989; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: X52330);

ES 2 286 141 T3

pBluescriptII SK(+) (Alting-Mees y col., 1989; GenBank/EMBL número de registro de secuencia: X52328).

En lo que respecta a la proteína de interés no hay limitaciones en términos de secuencia, en el supuesto de que la expresión del plásmido en *E. coli* permita obtener la proteína funcional.

En los ensayos de la presente invención se utiliza el cDNA que codifica a la Cu-Zn-superóxido-dismutasa humana. A partir de un vector que lleva a este cDNA puede producirse una proteína dímera de 32 kDa, muy soluble, que consta de 153 aminoácidos y se segrega en el citoplasma (Cserjan-Puschmann y col., 1999).

Puede utilizarse cualquier célula hospedante bacteriana que sea compatible con los plásmidos de tipo ColE1, con preferencia con las cepas de *E. coli*, en particular con la cepa HMS 174 (DE3) (Studier y Moffat, 1986) o con cepas de *Salmonella*.

En otra forma de ejecución, la presente invención se refiere a una célula hospedante transformada con el vector de expresión que lleva la replicación modificada de ColE1.

Para la transformación de la célula hospedante puede utilizarse cualquier técnica convencional, p.ej. la electroporación o la precipitación con cloruro cálcico o con calcio.

En otra forma de ejecución, la presente invención se refiere a un método para producir una proteína recombinante de interés, en el que se transforma una célula hospedante de *E. coli* con un vector de expresión que tenga un sistema de replicación de ColE1 con una mutación en uno o más bucles del gen de RNAI y RNAII, cultivada en condiciones idóneas y se recupera la proteína de interés. La invención acelera el desarrollo del proceso de producción de la proteína recombinante proporcionando una herramienta para compensar la interferencia resultante de la expresión de proteínas recombinantes con el metabolismo del hospedante. El método de la invención es particularmente ventajoso en procesos de fermentación por alimentación por partidas, es decir, procesos en los que la adición de nutrientes se efectúa en función del aumento de la biomasa. Para explotar plenamente los ventajas de los procesos de alimentación discontinua, que pueden realizarse a lo largo de períodos prolongados de tiempo con una gran producción de biomasa y con ventaja económica respecto a los procesos clásicos por partidas, se requiere un sistema de expresión estable y regulable. Este requisito puede satisfacerse con el uso del vector de expresión de la invención.

Por otro lado, dado que las alteraciones de la secuencia de uno o más bucles del RNAI de ColE1 y del RNA I pueden servir para aumentar en gran manera las proporciones de replicación de plásmidos, los vectores son muy útiles para la producción de plásmidos, p.ej. para el uso en terapia genética. Las ventajas de la presente invención estriban en la posibilidad de disminuir la estabilidad del llamado “complejo de beso” entre el RNA I y el RNA II, aumentando de este modo las proporciones de replicación de plásmidos.

Ejemplo 1

El plásmido empleado en los ensayos es el pET11a (derivado del pUC19 de Stratagene). Este plásmido contiene el gen de beta-lactamasa para la resistencia a la ampicilina. Se controla la expresión de la proteína recombinante en este plásmido con una RNA-polimerasa T7 eficaz. El operador lac está situado entre el promotor T7 y las secuencias de inicio de la traducción. De aquí resulta la represión en ausencia del inductor IPTG. El plásmido pET11a-SOD contiene un gen cDNA que codifica a la proteína recombinante Cu-Zn-superóxido-dismutasa humana (hSOD), una proteína dímera, de 32 kDa, muy soluble, de 153 aminoácidos, que no es tóxica para la célula y se segrega en el citoplasma (Cserjan-Puschmann y col., 1999).

La cepa bacteriana empleada para la propagación y expresión del plásmido SOD es la *Escherichia coli* HMS174 (DE3) (Studier y Moffat, 1986). Esta cepa tiene integrada la polimerasa T7 en el DNA cromosómico. La polimerasa T7 es esencial para la propagación de la proteína recombinante. Los transformantes se eligen en placas amp (medio antibiótico LB, que contiene 100 µg/ml de ampicilina) (Maniatis y col., 1982). La técnica de transformación aplicada en estos ensayos es la electroporación utilizando un aparato Bio-Rad Gene Pulser. Los cebadores se obtienen de Metabion (Martinsried, Alemania) en forma de polvo secado con vacío, que se disuelve en agua para obtener soluciones patrón con la concentración de 100 pmoles/µl. La PCR se lleva a cabo en un aparato Thermoblock (gradiente T, Biometra, Alemania) de encamisado calefactable, empleando la polimerasa Dynazyme EXT 1 u/µl (Finnzymes), tampón 10X exento de Mg y 10 mM MgCl (suministrado), 1 mM dNTP, DMSO y agua destilada.

Los cebadores empleados son el pET11a-114back (SEQ ID NO: 1), pEZ11a656for (SEQ ID NO: 2), RNAI-Ncoback (SEQ ID NO: 3) y RNAI-Nco for (SEQ ID NO: 4). Las endonucleasas de restricción, marcadores lambda, la ligasa T4, la fosfatasa de intestino bovino, se obtienen de la empresa MBI-Fermentas y se utilizan con arreglo a sus recomendaciones.

El fermentador que se emplea es un fermentador de 20 litros de la empresa MBR Bioreactor AG (Wetzikon, Suiza), con un controlador MBR IMCS-2000 conectado al mismo. El volumen de trabajo del fermentador es de unos 12 litros.

Medio empleado para la alimentación: la cantidad de medio alimentado bombeado al sistema durante el estado de partida alimentada se mide a través de la determinación continua del nivel. Se regula la bomba de alimentación

ES 2 286 141 T3

para obtener una relación de crecimiento constante de $\mu = 0,1$. La adición de antiespumante se dispara con un sensor de conductividad. No hay contacto con el exterior, que implique un riesgo de contaminación para el fermentador. El medio empleado para la partida es un medio semisintético que contiene pequeñas cantidades de Tryptone y extracto de levadura para facilitar el cultivo en el inicio de la partida. Se mezclan los componentes en un volumen total de unos 4 litros (4000 g). Para evitar las precipitaciones se disuelven en primer lugar los compuestos químicos del mismo número (ver el n° en la siguiente tabla 1) en agua destilada por separado. Se completa la solución de glucosa hasta 300 g y se somete a autoclave por separado. A continuación se mezclan todos, excepto la solución de glucosa, en el orden indicado y se completa con agua hasta 3700 g.

TABLA 1

Composición del medio de la partida (4000 g). Los valores se expresan en gramos, a menos que se indique lo contrario

n°	peso (g)	compuesto químico
1	12	dihidrogenofosfato potásico
1	24	hidrogenofosfato dipotásico trihidratado
2	2	Tryptone (Oxoid Ltd., Hampshire, GB)
2	1	extracto de levadura
3	5	citrato trisódico dihidratado
3	2	sulfato magnésico heptahidratado
4	0,2	cloruro cálcico dihidratado
5	1000	solución de oligoelementos [μ l]
6	80	cloruro de cobre (II) dihidratado [mg]
6	64	sulfato de cinc heptahidratado [mg]
7	9	sulfato amónico
7	7,4	cloruro amónico
8	66	glucosa monohidratada

ES 2 286 141 T3

TABLA 2

Composición del medio de alimentación (6000 g) para el estado de partida alimentada. Los valores se expresan en gramos, a menos que se indique lo contrario

5

10

15

20

25

30

35

nº	peso (g)	compuesto químico
1	18,00	dihidrogenofosfato potásico
1	36,00	hidrogenofosfato dipotásico trihidratado
2	51,57	citrato trisódico dihidratado
2	20,63	sulfato magnésico heptahidratado
3	2,06	cloruro cálcico dihidratado
4	10313,71	solución de oligoelementos [μ l]
5	825,10	cloruro de cobre (II) dihidratado [mg]
5	660,08	sulfato de cinc heptahidratado [mg]
6	0,6	antiespumante
7	92,82	sulfato amónico
7	76,32	cloruro amónico
8	680,70	glucosa monohidratada

40

El ensayo de Koch se realiza para determinar la fracción de células bacterianas que contienen plásmidos y para determinar si las células que llevan plásmidos crecen en placas que contiene el inductor IPTG, esta última determinación indica si las células que llevan plásmidos producen el SOD en cantidades "normales" después de la inducción.

45

La masa seca bacteriana (BDM) indica la cantidad total de materia seca.

50

Para cada muestra se seca un embudo de vidrio a 105°C durante una noche, se enfría en un desecador y después se pesa en una balanza analítica.

55

El PCN se calcula a partir de la correlación de los tamaños (número de pares de bases) del DNA genómico y del DNA plásmido.

60

Para la preparación del DNA plásmido se suspende de nuevo el culote celular de la preparación de la muestra en 150 μ l de la solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, de pH 8,0), se le añaden 200 μ l de SDS (solución de SDS al 0,5% (ICN Biochemicals)) y 50 μ l de lisozima (Sigma), se mezcla la preparación, se incuba a 37°C durante 10 min y se homogeneiza en el vórtice. Se almacenan las muestras en hielo hasta que el momento de medir la fluorescencia en un espectrofluorímetro (Hitachi F-2000).

65

Para determinar la cantidad de DNA plásmido se purifica el DNA del culote celular con el kit GFX (MBI, Fermentas) con arreglo a las instrucciones del fabricante, efectuando las modificaciones siguientes: después del paso de la lisis se añade una cantidad conocida (aprox. 2 μ g) de pUC 19 como patrón interno. Después de la elución del DNA en 50 μ l de agua se efectúa la linealización del plásmido con Hind III a 37°C durante 1 hora. Se transfiere la muestra con el DNA digerido en restricción a un vial de muestras por electroforesis en capilar, evitando la inclusión de burbujas de aire. Se introducen las muestras en el aparato llamado autosampler. Se calibra el capilar por enjuague con tampón durante 15-20 min. La detección de la absorbancia se realiza a 260 nm y 280 nm con una matriz de diodos. Después del análisis se enjuaga el capilar con tampón y se almacena a 4°C.

ES 2 286 141 T3

La cantidad de DNA cromosómico se calcula restando la cantidad de DNA plásmido/mg de BDM del contenido total de DNA/mg de BDM. Dado que se conoce la cantidad del patrón interno añadido, el PCN podría calcular según Breuer y col. (1998) con arreglo a las fórmulas siguientes:

$$\begin{aligned}
 & \text{DNA plásmido en la muestra} = \frac{\text{patrón interno añadido}}{\text{patrón interno medido}} \times \text{DNA plásmido medido} \\
 & \text{PCN} = \frac{\Sigma \text{ pares de bases cromosómicos} \times \text{cantidad de DNA plásmido/mg de BDM}}{\Sigma \text{ pares de bases de plásmido} \times \text{cantidad de DNA plásmido/mg de BDM}}
 \end{aligned}$$

Para la determinación de la cantidad de SOD, se diluyen 1:100 los anticuerpos de captura (clon 30F11 de anticuerpo monoclonal SOD suministrado por Novocastra Laboratories Ltd., GB) en tampón de recubrimiento (200 µg/ml). Se transfieren 100 µl de la solución diluida de anticuerpo a cada hoyo de una placa de microvaloración, se incuban a 4°C durante una noche, o a temperatura ambiente durante 2 horas por lo menos. Se lava la placa tres veces con tampón de lavado y se quita el tampón golpeando suavemente. Se diluyen la muestra y el patrón en pasos 1:2 pasos con un robot pipeteador en una placa de dilución. Se transfieren (con el robot) 50 µl de cada una de las diferentes soluciones a la placa recubierta con el anticuerpo y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se lava la placa con tampón de lavado. Se diluye 1: 500 el anticuerpo conjugado en una dilución del tampón (Porstmann y col., 1988).

Las mutaciones dentro del origen de replicación se indican en la tabla 3 (en la tabla se recogen las posiciones cambiadas, los números referidos a la secuencia de ColE1 completa con arreglo a GI = "9507253" Genbank).

TABLA 3

692	G→C
694	T→A
695	A→T
696	C→G
697	C→G
698	A→T
699	A→T
700	C→G

En la figura se representa el proceso de fermentación empleando el plásmido en *E. coli* HMS 174 (DE3) pET11achSOD. Se representa la producción total y específica de la proteína recombinante (SOD), junto con la relación de producción, q_p . Se representa también el total de la materia seca bacteriana (BDM) y el número de copias de plásmidos (PCN). A diferencia de los procesos estándar (p.ej. el descrito por Cserjan-Puschmann, 1999), se observa que el PCN se mantiene aprox. constante incluso después de la inducción en la 45ª hora.

ES 2 286 141 T3

Los resultados del ensayo de Koch y el número de copias de plásmidos se recogen en la siguiente tabla 4.

TABLA 4

tiempo de fermentación [h]	CFU [ml ⁻¹]	CFU en placa de ampicilina	vehículo plásmido [%]	vehículo plásmido IPTG insens.	PCN
31	5,5 x 10 ⁹	5,13 x 10 ⁹	93,33	1,12 x 10 ⁷	
37	1,98x10 ¹⁰	1,96 x 10 ¹⁰	98,99	6,67 x 10 ⁶	50
41					48
45					42
46					38
47	3,03x10 ¹⁰	2,66 x 10 ¹⁰	87,69	1,63 x 10 ⁶	45
48					44
50					51
52	1,89x10 ¹⁰	1,43 x 10 ¹⁰	75,70	1,38 x 10 ⁶	34

Ejemplo 2

El plásmido empleado para los ensayos es el pET11a-SOD ya descrito en el ejemplo 1.

La cepa bacteriana empleada para la propagación y expresión del plásmido SOD es la *Escherichia coli* HMS174 (DE3), descrita en el ejemplo 1. Todas las manipulaciones de la bacteria y del DNA plásmido se realizan del modo descrito en el ejemplo 1. Los oligonucleótidos y enzimas se obtienen de las mismas fuentes que se indican en el ejemplo 1.

Los cebadores que se emplean son el pET11a-Sca-I-for (SEQ ID NO: 5), el pET11a-AlwN-I (SEQ ID NO: 6), el pET11a-Xba-I-back (SEQ ID NO: 7) y el RNA-I-randomXba-I-back (SEQ ID NO: 8).

Para explorar los mejores candidatos del conjunto de los diferentes clones se adoptan dos estrategias:

1. Selección de células con un número alto de copias de plásmidos

Las células de un PCN elevado deberán tener una gran resistencia a la ampicilina. Se coloca el conjunto de las bacterias en cápsulas petri sobre agar-LB que contienen 0,1; 1; o 10 mg/ml de ampicilina. Se toman 10 colonias de la placa de 10 mg/ml de LB-Amp y se analizan sus secuencias. El resultado indica que existen 7 clones (ver tabla 5) que son diferentes en lo que respecta a la secuencia del bucle 2 del RNA I y RNA II.

ES 2 286 141 T3

TABLA 5

	RNAI I	RNAI	
5			
	ColE1Mut1	ATCTACA	TGTAGAT
10	ColE1Mut9	ATCTACA	TGTAGAT
	ColE1Mut2	TGGATAC	GTATCCA
15	ColE1Mut3	TTCACCC	GGGTGAA
	ColE1Mut4	CTGTATC	GATACAG
20	ColE1Mut5	AACATCC	GGATGTT
	ColE1Mut7	AACATCC	GGATGTT
25	ColE1Mut8	AACATCC	GGATGTT
	ColE1Mut6	GCTAGCG	CGCTAGC
30	ColE1Mut10	ACTGAAG	CTTCAGT

El segundo criterio de exploración es la estabilidad de los plásmidos. Se cultivan las bacterias que contienen el conjunto de plásmidos en matraces agitables a 37°C hasta que la OD = 2 empleando un medio sintético, sin ampicilina. Después de tres pasajes (correspondientes a aproximadamente 20 generaciones) se extienden las bacterias del último pasaje sobre una placa LB-amp para seleccionar las bacterias que todavía contienen un plásmido, se toman las bacterias individuales para analizar sus secuencias.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 286 141 T3

Los resultados de esta exploración se recogen en la tabla 6.

TABLA 6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	RNAI	RNAII		RNAI	RNAII
Cole1Mut11	TTATGAG	CTCATAA	Cole1Mut41	CACCCAA	TTGGGTG
Cole1Mut12	TTGCCAC	GTGGCAA	Cole1Mut42	GCGGAAA	TTTCCGC
Cole1Mut13	CTTACGA	TCGTAAG	Cole1Mut43	GTGTCAA	TTGACAC
Cole1Mut14	CATGCAA	TTGCATG	Cole1Mut44	TCGCCNG	CNGGCCA
Cole1Mut15	GTGACAA	TTGTCAC	Cole1Mut45	TCGCCNG	CNGGCCA
Cole1Mut16	CCGACAA	TTGTCGG	Cole1Mut46	TTTCCCG	CGGGAAA
Cole1Mut17	GGGAAA	TTTCCCC	Cole1Mut47	TACCCCG	CGGGGTA
Cole1Mut18	CTCGCCT	AGGCGAG	Cole1Mut48	TCGCTAG	CTAGCGA
Cole1Mut19	AGGCCCT	AGGGCCT	Cole1Mut49	TCTTGCC	GGCAAGA
Cole1Mut20	TTGGTAG	CTACCAA	Cole1Mut50	TTGGTAC	GTACCAA
Cole1Mut21	ATAGCAG	CTGCTAT	Cole1Mut51	TCACCAC	GTGGTGA
Cole1Mut22	TTGAGAT	ATCTCAA	Cole1Mut52	CCGCGAA	TTCGCGG
Cole1Mut23	TTGGTAG	CTACCAA	Cole1Mut53	ACGCAAA	TTTGCCT
Cole1Mut24	TTAGCGT	ACGCTAA	Cole1Mut54	CTGAACT	AGTTCAG

ES 2 286 141 T3

	RNAI	RNAII		RNAI	RNAII	
5	ColeE1Mut25	TTCTGCT	AGCAGAA	ColeE1Mut55	CCCCCAT	ATGGGGG
	ColeE1Mut26	TTGCCAT	ATGGCAA	ColeE1Mut56	CCCCCAT	ATGGGGG
10	ColeE1Mut27	GATGGTT	CTACCAA	ColeE1Mut57	TTTGCCG	CGGCAAA
	ColeE1Mut28	TTTTCGC	GCGAAAA	ColeE1Mut58	TTCGCCG	CGGCGAA
15	ColeE1Mut29	TACCCCC	GGGGGTA	ColeE1Mut59	TTCGCCG	CGGCGAA
	ColeE1Mut30	CATTCGA	TCGAATG	ColeE1Mut60	GAGGTAG	CTACCTC
20	ColeE1Mut31	GTTCCGA	TCGGAAC	ColeE1Mut61	TGTCCAG	CTGGACA
	ColeE1Mut32	GTAGCCA	TGGCTAC	ColeE1Mut62	CCTCTAA	TTAGAGG
25	ColeE1Mut33	ACTCTAA	TTAGAGT	ColeE1Mut63	ACGCAAA	TTTGCGT
	ColeE1Mut34	CTTGGA	TTCCAAG	ColeE1Mut64	TGGGTAG	CTACCCA
30	ColeE1Mut35	CCCCCAA	TTGGGGG	ColeE1Mut65	TCTTCAC	GTGAAGA
	ColeE1Mut36	TTGGTGT	ACACCAA	ColeE1Mut66	TTAGCAC	GTGCTAA
35	ColeE1Mut37	TTGCAAT	ATTGCAA	ColeE1Mut67	TTGGTAG	CTACCAA
	ColeE1Mut38	TTGCGAG	CTCGCAA			
40	ColeE1Mut39	TGGTCAG	CTGACCA			
	ColeE1Mut40	ATGTCAA	TTGACAT			

45 El fermentador y accesorios empleados para esta exploración son los mismos que se han descrito en el ejemplo 1. Los medios alimentados y la velocidad de crecimiento son las mismas que se han descrito en el ejemplo 1.

Se determina y se calcula el PCN del modo descrito en el ejemplo 1. El comportamiento de los clones candidatos en lo que respecta a su PCN se caracteriza en los cultivos de partida alimentada. Los resultados de los candidatos 50 prometedores se recogen en la tabla 7; el PCN de diferentes clones se indica para el estado sin inducir e inducido.

TABLA 7

55		sin inducir	inducido 3 h	inducido 5 h
	ColeE1WT	54	129	298
60	ColeE1Mut9	750	2560	600
	ColeE1Mut22	136	243	380
65	ColeE1Mut54	34	63	93

Se observa que el ColE1Mut9 (y el ColE1Mut1, que tiene la misma secuencia) es un candidato muy prometedor para la producción de plásmidos. Un número de copias de plásmidos de 750 significa un aumento de 14 veces, si se compara con el plásmido ColE1 de tipo salvaje.

5 El PCN del clon ColE1Mut22 es también más elevado (factor 2,5).

El PCN más bajo del clon ColE1Mut54 podría ser beneficioso para la producción de proteína recombinante debido a su menor carga metabólica.

10 Referencias

Altling-Mees, M.A. y Short, J.M., pBluescript II: gene mapping vectors, *Nucleic Acids Res.* 17, 9494, (1989).

15 **Breuer, S. y col.** Off-line quantitative monitoring of plasmid copy number in bacterial fermentation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 2474-2478, (1998).

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. y Boyer, H.W., Construction and caracterización of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system, *Gene* 2, 95-113, (1977).

20 **Cesareni, G., Helmer-Citterich, M., Castagnoli, L.**, Control of plasmid ColE1 replication by antisense RNA. *Trends Genet.* 7, 230-5, 7 de julio de 1991.

Chan, P.T., Ohmori, H., Tomizawa, J., Lebowitz, J., Nucleotid sequence and gene organization of ColE1 DNA. *J. Biol. Chem.* 260, 15 8925-35, 25 de julio de 1985.

25 **Cserjan-Puschmann, M., W. Kramer, E. Durrschmid, G. Striedner y K. Bayer**, Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microb. Biotechnology* 53, 43-50, (1999).

30 **Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberon, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y. M. y Bolivar, F.**, Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328, *Gene* 13, 25-35, (1981).

Gulyaev, A. y col., The influence of a metastable structure in plasmid primer RNA on antisense RNA binding kinetics. *Nucleic Acids Res.* 23 (18), 3718-25, 25 de setiembre de 1995.

35 **Hjalt, T., Gerhart, E. y Wagner, H.**, The effect of loop size in antisense and target RNAs on the efficiency de antisense RNA control. *Nucleic Acids Research* 20, 24, 6723-6732, (1992).

40 **Lin-Chao, S. y Cohen, S.**, The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1 -type plasmids *in vivo*. *Cell* 65, 1233-1242, (1991).

Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, Nueva York* (1982).

45 **Merlin, A. y Polisky, B.**, Assessment of quantitative models for plasmid ColE1 copy number control. *J. Mol. Biol.* 248, 211-219, (1995).

50 **Portstmann, T., Wietschke, R., Schmechta, H., Grunow, R., Porstmann, B., Bleiber, R., Pergande, M., Stachat, S. y Baehr, R.**, Rapid and Sensitive enzyme immuno assay for Cu/Zn superoxide dismutase with polyclonal and monoclonal antibodies. *Clinica Chimica Acta* 171, 1-10, (1988).

Studier, F.W. y Moffat, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polimerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130, (1986).

55 **Tomizawa, J.**, Control of ColE1 plasmid replication: Initial interaction of RNAI and the primer transcript is reversible, *Cell* 40, 527-535, (1985).

Tomizawa, J., Control of ColE1 plasmid replication, intermediates in the binding of RNAI and RNAII, *J. Mol. Biol.* 212, 683-694, (1990).

60 **Wróbel, B. y Wegrzyn, G.**, Replication regulation of ColE1 -like plasmids in amino acid starved *Escherichia coli*. *Plasmid* 39, 48-62, (1998).

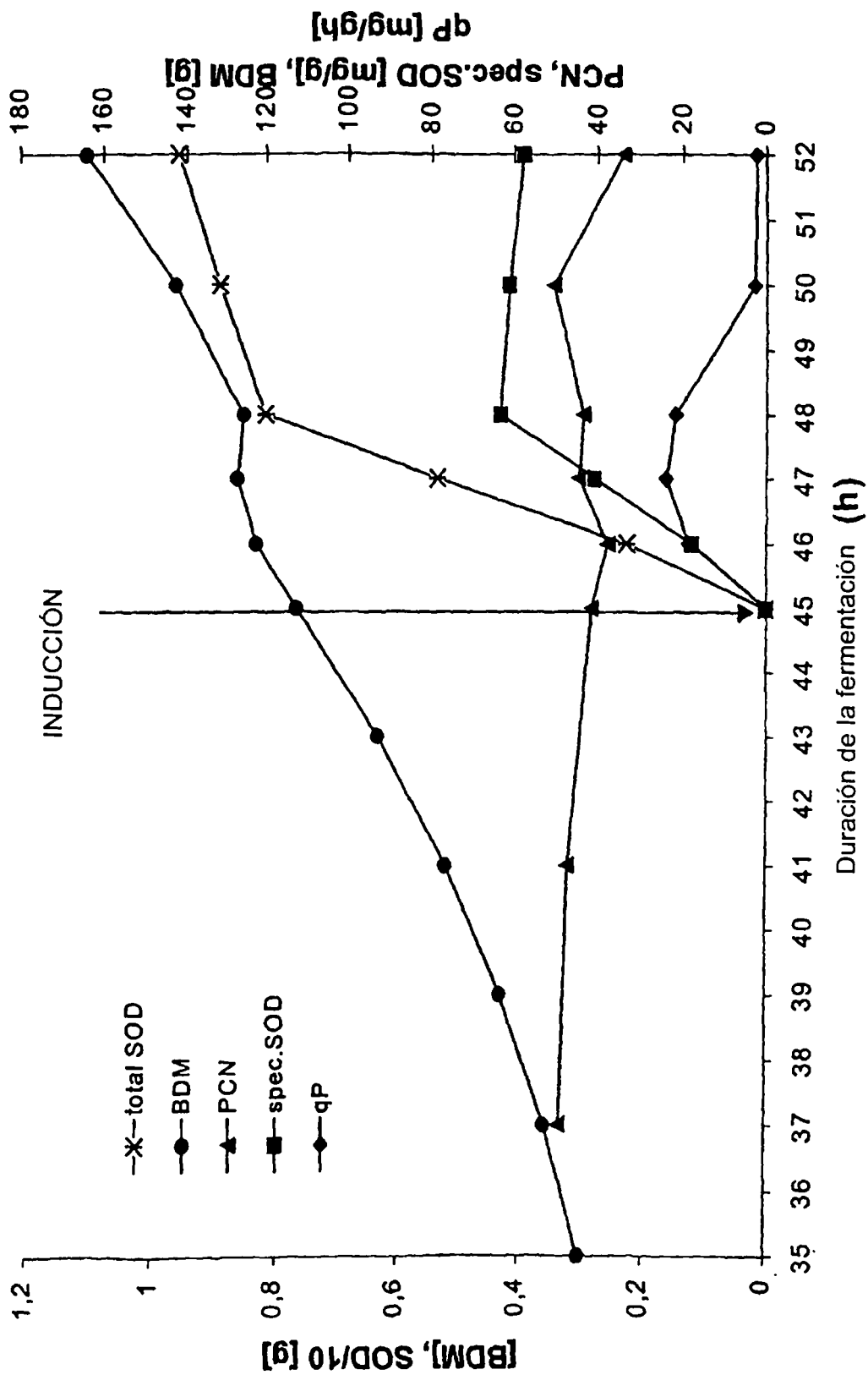
65 **Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J.**, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119, (1985).

Zavachev, L. e Ivanov, I., What does the homology between *E. coli* tRNAs and RNAs controlling plasmid ColE1 replication mean? *J. theor. Biol.* 131, 235-241, (1988).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión que tiene un sistema de replicación de ColE1, en el que la homología del RNAI y RNAII del origen de replicación ColE1 con las tRNA no cargados se modifica con una o más mutaciones en la región codificadora del gen RNAI y una o más mutaciones correspondientes en el gen RNAII, dicha mutación o mutaciones producen uno o más intercambios de bases en el bucle 1 y/o en el bucle 2 y/o en el bucle 3 del RNAI y RNAII.
- 10 2. El vector de expresión de la reivindicación 1, que se deriva de un vector elegido entre pMB1, pBR322, pUC 18/19, pTZ19R, pTZ19U, pBluescriptII KS(+/-) y pBluescriptII SK(+/-).
3. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que dicha mutación produce una disminución o la abolición de la homología de RNAI/RNAII con respecto a los tRNA no cargados.
- 15 4. El vector de expresión de la reivindicación 3, en el que dicha mutación se produce en el bucle 2 de RNAI y RNAII.
5. El vector de expresión de la reivindicación 4, en el que el bucle 2 de RNAI y RNAII se modifica con una mutación esencialmente de su secuencia completa.
- 20 6. El vector de expresión de la reivindicación 5, en el que se reemplazan seis de sus siete bases del bucle 2 por sus bases complementarias respectivas.
7. El vector de expresión de la reivindicación 6, en el que el bucle 2 de RNAI contiene la secuencia TGTAGAT en lugar de la secuencia del tipo salvaje y en el que el bucle 2 de RNAII contiene la secuencia ATCTACA en lugar de la secuencia de tipo salvaje.
- 25 8. El vector de expresión de la reivindicación 6, en el que el bucle 2 de RNAI contiene la secuencia CTGAACT en lugar de la secuencia de tipo salvaje UUGGUAG y en el que el bucle 2 de RNAII contiene la secuencia AGTTCAG en lugar de la secuencia de tipo salvaje CUACCAA.
- 30 9. Una célula hospedante bacteriana transformada con un vector según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8.
- 35 10. La célula hospedante de la reivindicación 9, que es una célula de *E. coli*.
11. La célula hospedante de la reivindicación 10, que es una célula de la cepa HMS 174 de *E. coli*.
- 40 12. El uso del vector de expresión de la reivindicación 7 para producir una proteína recombinante de interés en *E. coli*.
13. El uso del vector de expresión de la reivindicación 8 para producir DNA plásmido en *E. coli*.
- 45 14. Un método para producir una proteína de interés, en el que se transforma un vector según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, que contiene el DNA que codifica a la proteína unido operativamente a la secuencia de control de expresión, en una célula hospedante bacteriana compatible con el sistema de replicación de ColE1, se cultiva la célula hospedante en condiciones apropiadas, se recupera y se purifica la proteína de interés.
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1



ES 2 286 141 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Boehringer Ingelheim International GmbH
- 5 <120> Vectores de expresión con origen de replicación ColE1 modificado para el control del número de copias de plásmidos
- <130> Case 12_218_PCT
- <140>
- 10 <141>
- <160> 8
- <170> PatentIn ver. 2.1
- <210> 1
- 15 <211> 19
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 1
- 25 gacttatcgc cactggcag 19
- <210> 2
- <211> 19
- 30 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 2
- 40 gagcgtgaca ccacgatgc 19
- <210> 3
- <211> 32
- 45 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 50 <400> 3
- 55 gatgatccat ggtcttgatc cggcaaacia ac 32
- <210> 4
- <211> 36
- 60 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 65

ES 2 286 141 T3

<400> 4		
	gatgatccat gggtgtcttt ttccgaaggt aactgg	36
5	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 5	
	gacactgacc actcatgagt tggttc	26
20	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 6	
	gacttatc gccactgg cag	23
35	<210> 7	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 7	
45	ggtagctcta gatccggcaa acaaaccacc g	31
	<210> 8	
50	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 8	
60	gccggatcta gannnnnnn ctcttttcc gaaggtact gg	42
65		