



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 677**

51 Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C12N 15/73 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01964014 .3**
86 Fecha de presentación : **15.08.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1309604**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Superproducción de proteínas y péptidos biológicamente activos dependiente de fago.**

30 Prioridad: **15.08.2000 US 225437 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Phage Biotechnology Corporation**
1635 Village Center Cir., Ste. 260
Las Vegas, Nevada 89134, US
CardioVascular BioTherapeutics, Inc.

72 Inventor/es: **Kordyum, Vitaliy, A.;**
Chernykh, Svitlana, I.;
Slavchenko, Iryna, Yu y
Vozianov, Oleksandr, F.

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 284 677 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

Superproducción de proteínas y péptidos biológicamente activos dependiente de fago.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la tecnología de ADN recombinante y más particularmente a un nuevo método para aumentar la producción de proteínas heterólogas en células huésped bacterianas. El método divulgado implica infectar las células huésped, que contienen un plásmido que codifica el gen de interés conectado operativamente al promotor T7, con bacteriófago λ para inducir la lisis de las células huésped bacterianas. La superproducción se puede alcanzar en las células seleccionadas bien cuando sólo el plásmido lleva al menos una copia del ADN heterólogo o bien cuando ambos plásmido y fago λ llevan cada uno al menos una copia del ADN heterólogo.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Actualmente, los métodos de ingeniería genética permiten crear cepas de microorganismos capaces de producir cantidades considerables de diversas sustancias bioactivas que tienen importantes aplicaciones en la medicina y la industria. Típicamente, se usan vectores plasmídicos en los que se ha insertado un gen heterólogo para transformar células huésped bacterianas. Diferentes cepas de *E. coli*, se usan frecuentemente como células receptoras. Utilizando estos métodos de transformación dependientes de plásmidos se han creado células de *E. coli* que producen una variedad de proteínas y péptidos humanos valiosos, incluyendo insulina, interferón gamma, un número de interleuquinas, súper óxido dismutasa, activador del plasminógeno, factor de necrosis tumoral, eritropoyetina etc. Estas sustancias o están en uso en la práctica médica o están en diferentes fases de estudios clínicos.

Sin embargo, el método de los plásmidos tiene serios inconvenientes. Tecnológicamente es complicado, ya que el producto deseado se tiene que extraer de las células bacterianas tras la biosíntesis, lo que implica varias etapas. Por ejemplo, la extracción del interferón implica la desintegración de las células, la extracción en tampón, el procesamiento en polietilenglicol, la iluminación, la sedimentación con sulfato de amonio, la diálisis y la centrifugación (Goeddel, EP 0043980). La necesidad de tales pasos de extracción y purificación no sólo complica la tecnología de producción del producto recombinante, sino que también resulta en pérdidas sustanciales, especialmente durante la producción industrial a gran escala.

Un factor que aumenta la complicación es que a niveles relativamente altos de expresión de los genes clonados, las proteínas eucarióticas generadas tienden a acumularse en el citoplasma de *E. coli* como agregados insolubles, que se asocian con frecuencia con las membranas celulares. Por consiguiente, los ya difíciles métodos de extracción y purificación discutidos anteriormente se deberían suplementar con procedimientos técnicos encaminados a la extracción de cuerpos de inclusión insolubles. Normalmente, las proteínas insolubles se solubilizan usando detergentes iónicos, como SDS o laurilsarcosina, a temperaturas elevadas o en presencia de desnaturizantes, como urea 8M o guanidina-HCl 6-8M.

Con frecuencia, el paso final de la purificación implica renaturalización y reoxidación de los polipéptidos solubilizados, requeridas para reestablecer la actividad funcional. Los puentes disulfuro, que son necesarios para el plegamiento correcto de la proteína en su conformación nativa, tienen que volver a formarse. Los procesos de renaturalización, como el intercambio disulfuro, pueden requerir reactivos caros y relativamente tóxicos, como el glutatión, 2-mercaptoetanol o ditioneitol oxidados. Además, el rendimiento final de proteínas bioactivas producidas por ingeniería genética puede ser relativamente bajo. Además, la presencia de reactivos tóxicos incluso a concentraciones traza, necesarios para solubilizar y después reestablecer la estructura secundaria y terciaria de la proteína puede impedir las posteriores aplicaciones clínicas de las proteínas. Así, la generación de proteínas diana en la forma de cuerpos de inclusión insolubles en las células huésped bacterianas no sólo complica la producción de proteínas recombinantes y resulta en un rendimiento bajo, sino que también puede hacer la proteína final inadecuada para uso clínico (Fisher, B., Summer, I., Goodenough, P. Biotech. And Bioeng. 41:3-13, 1993).

Las dificultades tecnológicas asociadas con la extracción de proteínas producidas por la expresión de genes heterólogos en células huésped bacterianas transformadas con plásmidos se pueden superar infectando las células huésped bacterianas con un bacteriófago, cuya vía lítica resulta en la lisis de la célula portadora. Así, la proteína deseada se puede simplemente liberar al medio de cultivo (Breeze A.S. GB 2 143 238A). Así pues, Breeze describe un método para aumentar el rendimiento de enzima producida en *E. coli* infectando las células bacterianas con un fago λ que lleva una mutación sensible a temperatura en cI que proporciona una lisis controlada. El producto del gen cI es un represor de la transcripción temprana y por consiguiente bloquea la transcripción de la región tardía del ADN del fago, que se requiere para el ensamblaje de cabeza y cola y la lisis celular (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los bacteriófagos que llevan una mutación sensible a temperatura en cI son capaces de establecer y mantener el estado lisogénico siempre que las células se propaguen en la temperatura que permita al producto del gen cI reprimir la transcripción de los genes del fago necesarios para el crecimiento lítico. Así pues, las células huésped bacterianas transformadas se pueden cultivar a 30°C, en donde la supresión mediada por cI de la transcripción del ADN del fago continúa y el fago se mantiene en el estado lisogénico, hasta que se alcanza el estado de máxima producción de fermento. Después, se puede incrementar la temperatura del cultivo a 42°C durante 30 minutos para inactivar el represor cI y permitir al fago empezar su desarrollo

ES 2 284 677 T3

lítico. Las células huésped se pueden entonces incubar 2-3 horas a 30°C para permitir la lisis completa y la liberación de la enzima (Breeze A.S. GB 1243 238A).

Aunque Breeze enseña liberación de proteínas de las células bacterianas productoras, requiere cultivar los productores a temperaturas no superiores a 30°C, que no es la temperatura óptima de crecimiento para las células de *E. coli*. La síntesis a la temperatura óptima (37°C) no es posible, ya que las células a temperaturas superiores a 32°C experimentan lisis antes de alcanzar el estado de máxima acumulación de fermento debido al desarrollo del profago lítico sensible a temperatura. Además, la incubación de las células huésped bacterianas a 42°C durante 30 minutos como divulga Breeze puede activar proteasas que destruyan la proteína diana.

Auerbach *et al.* (Patente de EEUU n° 4,637,980) usaron un fragmento de ADN del fago λ para inducir la liberación lítica de productos recombinantes. En ese método, al igual que Breeze, la mutación sensible a temperatura en el producto del gen *cI* de λ se usó para producir lisis de las células huésped bacterianas dependiente de temperatura. El fragmento de ADN de λ en Auerbach mantiene funcionales los genes que codifican las endolisinas, N, Q, R y S, para producir lisozima tras la inactivación del represor a 42°C. La mayoría de los otros genes del fago se deleccionaron; mutaciones en los genes O y P impidieron la replicación del ADN del fago. Por consiguiente, el ADN de λ no era un fago totalmente funcional, capaz de modular la expresión del gen diana. Además, el ADN de λ de Auerbach no era apropiado para usar como vector que lleva genes diana. Además, como se ha discutido anteriormente, la incubación de las células huésped bacterianas de 42°C a 44°C durante 90-120 minutos como describe Auerbach puede activar proteasas que destruyen las proteínas diana.

Además de asegurar la liberación lítica de proteínas intactas de células bacterianas productoras, los bacteriófagos también se han usado como una alternativa a los vectores bacterianos basados en plásmidos, para llevar ADN heterólogo a las células huésped bacterianas. (Murray, N.E. y Murray, K., *Nature* 251:476-481, 1974; Moir, A., Brammar, W.J., *Molec. gen. Genet.* 149:87-99, 1976). Típicamente, la amplificación de genes y sus productos se alcanza durante el crecimiento lítico del fago, en donde el genoma del fago se integra en el ADN del huésped bacteriano (Panasenko, S.M., Cameron, J.R., Davis, R.V., Lehman, L.R., *Science* 196:188-189, 1977; Murray, N.E. y Kelley, W.S., *Molec. Gen. Genet.* 175:77-87, 1979; Walter, F., Siegel, M., Malke, H., 1990, DD276,694; Mory, Y., Revel, M., Chen, L., Sheldon; I.F., Yuti-Chernajovsky, 1983, GB2,103,222A). Normalmente, se usan cultivos lisogénicos de fago λ recombinante para infectar las células huésped bacterianas, o se crecen cultivos bacterianos "templados", que ya llevan el fago λ lisogénico recombinante, para amplificar la expresión de genes heterólogos.

Aunque hay ejemplos de uso con éxito de vectores λ para expresión de genes heterólogos, los vectores λ se han usado principalmente para la clonación de genes. Una vez clonados, los genes se transfieren a vectores plasmídicos para una expresión más efectiva. Por ejemplo, cuando se infecta *E. coli* con el fago λ Charon 4A C15, que contiene el gen del interferón β humano, la cantidad de interferón en lisado de células constituyó $7-8 \times 10^6$ unidades/litro. Después de que el fragmento de ADN que lleva el gen diana se reclonara del fago a un plásmido la producción de interferón β aumentó a 1×10^8 unidades/litro (Moir, A., Brammar, W.J., *Molec. gen. Genet.* 149:87-99, 1976).

Para incrementar la producción de proteínas heterólogas generadas en células huésped bacterianas por vectores λ recombinantes, se han introducido mutaciones en el genoma del fago que causan que el fago λ pierda su capacidad de iniciar la lisis de células bacterianas. El aumento en el rendimiento se alcanza por lo tanto extendiendo el período de tiempo durante el que se expresa el gen heterólogo en las células huésped bacterianas. Así, por ejemplo, la producción de ADN ligasa 1 en cultivos lisogénicos que contienen el profago λ gt4ligS, con la mutación ámbar en el gen S, fue cinco veces mayor que la producción de ADN ligasa 1 en cultivos lisogénicos que contienen el profago λ gt4lig sin la mutación ámbar (Panasenko, S.M., Cameron, J.R., Davis, R.V., Lehman, L.R., *Science* 196:188-189, 1977). La proteína S del fago λ se requiere para la lisis; por lo tanto los mutantes S acumulan un alto número de partículas intracelulares de fagos progenie, así como de proteína diana, sin que se lisen las células huésped (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Se han descrito aumentos similares en la producción de ADN ligasa 1 en cultivos lisogénicos que contenían fagos λ recombinantes con mutaciones ámbar en los genes S y Q, comparados con fago λ recombinante sin las mutaciones ámbar (Murray, N.E. y Kelley, W.S., *Molec. Gen. Genet.* 175:77-87, 1979). La proteína Q del fago λ se requiere para la transcripción de la región tardía del ADN del fago, que incluye muchos genes implicados en el ensamblaje de cabeza y cola y en la lisis celular (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

En la patente de EE UU n° 4,710,463, Murray describe lisogenización de una cepa de *E. coli* no supresora (Su⁰) con fago λ que contiene la mutación sensible a temperatura en *cI*, así como mutaciones en los genes S y E de λ . Por consiguiente, el cultivo prolongado de *E. coli* lisogénica a 37°C conduce a altos niveles de producción de la proteína recombinante, que se retiene en las células ya que éstas no son lisadas por los productos de los genes del fago de la forma normal, y puesto que el genoma del fago recombinante no se encapsida, se mantiene disponible para la transcripción.

A pesar del aumento de la producción de proteínas heterólogas que es posible usando vectores λ con mutaciones en N, R, S, Q y/o E, las potenciales ventajas técnicas de los vectores bacteriófagos referidos a la liberación lítica de proteínas diana, se puede perder con estas mutaciones, porque las proteínas diana se acumulan dentro de la célula. Así, cuando un vector λ mutante deficiente en lisis se usa para la producción de proteínas heterólogas, se deben llevar

ES 2 284 677 T3

a cabo los pasos de extracción y purificación, discutidos anteriormente para las células bacterianas transformadas con vectores plasmídicos, junto con las pérdidas resultantes.

El sistema del promotor T7/ARN polimerasa T7 es útil para obtener un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes. El uso del promotor T7 requiere la presencia de ARN polimerasa T7. La ARN polimerasa T7 se puede suministrar mediante inducción del gen de la polimerasa T7 recombinante contenido en un lisógeno en la cepa huésped o por transformación con un plásmido para la expresión del gen de la polimerasa T7. La ARN polimerasa T7 es muy específica para su propio promotor. Las reacciones de transcripción desde el promotor T7 son muy eficientes y se pueden producir muchas copias de ARN de longitud completa desde cada molde.

Compendio de la invención

En una forma de realización, se describe un método para producir una proteína biológicamente activa, que incluye los pasos de:

transformar una cepa de *E. coli* con un plásmido que tiene al menos una copia de un gen expresable que codifica una proteína biológicamente activa, conectado operativamente al promotor de la polimerasa T7, en donde la cepa de *E. coli* es capaz de expresar el gen de la ARN polimerasa T7;

infectar las células huésped bacterianas transformadas con un bacteriófago capaz de mediar lisis retardada; y

cultivar las células huésped de *E. coli* en unas condiciones de cultivo que inducen el crecimiento lítico de dichas células sin lisis hasta que se alcanza el nivel de producción deseado de dicha proteína, en donde dicha proteína se produce como una proteína soluble y biológicamente activa.

En una forma de realización preferida, el bacteriófago tiene una mutación sensible a temperatura. En una forma de realización más preferida, la mutación sensible a temperatura es cI_{857} .

Preferiblemente, las células huésped de *E. coli* se hacen crecer a una temperatura que previene el crecimiento lítico del bacteriófago, antes del paso de cultivo.

En una forma de realización preferida, el bacteriófago tiene una mutación en al menos un gen capaz de mediar lisis retardada. En una forma de realización más preferida, el al menos un gen capaz de mediar lisis retardada se selecciona del grupo consistente en N, Q y R.

En una forma de realización preferida, la cepa de *E. coli* produce un supresor para la reparación de mutaciones ámbar.

En una forma de realización alternativa la cepa de *E. coli* carece de supresor para la reparación de mutaciones ámbar.

En una forma de realización preferida, el bacteriófago que infecta se proporciona a una multiplicidad de infección en un rango de entre alrededor de 1 y alrededor de 100. En una forma de realización más preferida, el bacteriófago que infecta se proporciona a una multiplicidad de infección en un rango de entre alrededor de 10 y alrededor de 25.

Preferiblemente, la lisis retardada mediada por bacteriófago de la cepa de *E. coli* se retrasa a multiplicidades de infección más altas relativa a multiplicidades de infección más bajas.

En una forma de realización, el gen expresable codifica el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano. En una forma de realización alternativa, factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 134 aminoácidos. En otra forma de realización alternativa el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 140 aminoácidos. En otra forma de realización alternativa el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 146 aminoácidos. En otra forma de realización alternativa el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 155 aminoácidos. En la forma de realización más preferida, el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

En una forma de realización, el gen expresable codifica una hormona de crecimiento humana. En una forma de realización alternativa, el gen expresable codifica un interferón humano. En otra forma de realización, el gen expresable codifica una metionina amino peptidasa de *E. coli*.

En una forma de realización preferida, el gen de la ARN polimerasa T7 está bajo el control de un promotor inducible. En una forma de realización más preferida, el promotor inducible es un promotor lac UV5.

En una forma de realización preferida, se proporciona un método para producir una proteína biológicamente activa que incluye los pasos de:

- a) Hacer crecer una primera cepa de células de *E. coli*, que hospeda una cepa del bacteriófago λ , en donde el bacteriófago λ tiene una mutación sensible a temperatura,

- b) ajustar la temperatura para producir la lisis de la primera cepa de *E. coli* y liberar el bacteriófago λ ,
- c) proporcionar una segunda cepa de células de *E. coli* transformadas con un plásmido que tiene al menos una copia de un gen expresable y que codifica dicha proteína biológicamente activa, dicho gen expresable está conectado operativamente al promotor de la polimerasa T7 bajo el control de un promotor inducible, en donde a las células de la segunda cepa de *E. coli* se les puede inducir a expresar el gen de la polimerasa T7 mediante la adición de un inductor;
- d) infectar la segunda cepa de células de *E. coli*, con el bacteriófago λ , liberado de la primera cepa de células de *E. coli*, e
- e) incubar las células infectadas de la segunda cepa de *E. coli* en un medio de cultivo que contiene el inductor, de modo que la proteína se produce y se libera al medio de cultivo tras la lisis de las células de la segunda cepa de *E. coli*, en donde dicha proteína se produce como una proteína soluble, biológicamente activa y a una concentración mayor de 100 microgramos/ml.

La invención presentemente divulgada también recoge un ácido nucleico sintetizado químicamente que consiste esencialmente en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

Para el propósito de resumir la invención y las ventajas obtenidas sobre el estado anterior de la técnica, algunos objetos y ventajas de la invención se han descrito anteriormente. Por supuesto, debe entenderse que no todos esos objetos o ventajas se pueden necesariamente alcanzar de acuerdo con cualquier forma de realización de la invención. Así, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede representarse o llevarse a cabo de una manera que alcanza u optimiza una ventaja o un grupo de ventajas como se enseña aquí sin alcanzar necesariamente otros objetos o ventajas que se pueden enseñar o sugerir aquí.

Otros aspectos, características y ventajas de esta invención serán aparentes a partir de la descripción detallada o de las formas de realización preferidas que siguen.

30 Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de esta invención se describirán ahora con referencia a los dibujos de formas de realización preferidas que se proponen para ilustrar y no para limitar la invención.

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos sintetizada químicamente para un factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano (FGFah; 155 aminoácidos) (SEQ ID NO: 1) que se ha modificado por sustitución de codones que ocurren de forma natural por codones encontrados en proteínas con altos niveles de expresión en *E. coli* y la secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 2).

La Figura 2 muestra las modificaciones hechas en los 155 codones del FGFah sintetizado químicamente. FGFah fr HUMECGFB es la secuencia obtenida del GenBank (en NCBI) (SEQ ID NO: 3). FGFah 155 es la secuencia químicamente sintetizada de acuerdo con una forma de representación de la presente invención (SEQ ID NO: 1).

La Figura 3 muestra la construcción pET24-155@rev que contiene el gen FGFah 155 sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 1).

La Figura 4 muestra el FGFah 155 purificado por HPLC. En el electroforegrama: carril 1, 10 l de medio condicionado que contiene hFGF 155; carril 2: 7 l de FGFah 155 recombinante purificado en Heparina-Sepharosa (0.45 g/l); carril 3: 14 l de 80 l de FGFah 155 purificado por HPLC. El carril no marcado en el extremo izquierdo contiene los marcadores de peso molecular.

La Figura 5 muestra la construcción pET24-134@rev que contiene el gen FGFah 134 sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 3).

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos sintetizada químicamente para un factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano (134 aminoácidos) (SEQ ID NO: 4) que se ha modificado por sustitución de codones que ocurren de forma natural por codones encontrados en proteínas con altos niveles de expresión en *E. coli* y la secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 5).

La Figura 7 muestra la construcción pET24-140@rev que contiene el gen FGFah 140 sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 6).

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos sintetizada químicamente para un factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano (140 aminoácidos) (SEQ ID NO: 6) que se ha modificado por sustitución de codones que ocurren de forma natural por codones encontrados en proteínas con altos niveles de expresión en *E. coli* y la secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 7).

ES 2 284 677 T3

La Figura 9 muestra la construcción pET24ap-inf@rev que contiene el gen del interferón 2b sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 10).

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos sintetizada químicamente para interferón-2b humano (SEQ ID NO: 10) que se ha modificado por sustitución de codones que ocurren de forma natural por codones encontrados en proteínas con altos niveles de expresión en *E. coli* y la secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 11).

La Figura 11 muestra un gel de SDS-poliacrilamida al 12.5% que contiene proteínas producidas por el método dependiente de fago descrito aquí; carril 1, marcadores de peso molecular, 2 g de cada marcador; carril 2, 40 l de medio de cultivo que contiene proteína recombinante FGF 134; carril 3, 40 l de medio de cultivo que contiene proteína recombinante FGF 140; carril 4, 40 l de medio de cultivo que contiene interferón 2B recombinante; carril 5, 40 l de medio de cultivo que contiene proteína recombinante FGF 155; carril 6, 40 l de medio de cultivo que contiene hormona de crecimiento humana; carril 7, 40 l de medio de cultivo que contiene metionina amino peptidasa recombinante; carril 8, 40 l de medio de cultivo que contiene galactosidasa de *E. coli*.

La Figura 12 muestra un gel de SDS-poliacrilamida al 12.5% que contiene proteínas recombinantes purificadas de acuerdo a la invención aquí reivindicada: carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, 5 g de proteína FGF 134 purificada; carril 3, 5 g de proteína FGF 140 purificada; carril 4, 5 g de proteína FGF 146 purificada; carril 5, 5 g de proteína interferón 2B purificada; carril 6, 5 g de proteína FGF 155 purificada; carril 7, 5 g de proteína metionina amino peptidasa purificada; carril 8, marcadores de peso molecular.

Descripción detallada de una forma de realización preferida

Si bien la forma de realización descrita representa la forma de realización preferida de la presente invención, se debe entender que los expertos en la técnica producirán modificaciones sin separarse del espíritu de la invención. El alcance de la invención se determinará únicamente por las reivindicaciones adjuntadas.

El bacteriófago λ es útil como vector porque más del 40% del genoma viral no es esencial para el crecimiento lítico. Este área del genoma de λ , situado en la región central del ADN de λ , entre los genes J y N, puede reemplazarse por ADN heterólogo que codifica un producto deseado. Esta región se transcribe pronto durante la infección.

Para maximizar la expresión de un gen diana, cuya información de síntesis se registra en el área de los genes tempranos del fago, se deberían proporcionar condiciones especiales para el desarrollo del fago para asegurar la replicación correcta. Además, la transcripción del área temprana, que contiene el gen diana, se debería fomentar, mientras que la transcripción de los genes tardíos, implicados en la lisis celular, se debería desacelerar. Esto retarda la maduración de las partículas de λ y la posterior lisis celular. Por consiguiente, los productos tempranos del fago, incluido el producto del gen diana, se acumularán en las células bacterianas. La desaceleración de la transcripción tardía, de este modo extendiendo la expresión del gen diana, se puede llevar a cabo mediante: (1) mutaciones en el genoma del fago que bloquean la expresión de genes tardíos (2) multiplicidad de infección aumentada, y/o (3) cultivo de las células bacterianas infectadas a una temperatura reducida.

Una ventaja de infectar células productoras con un bacteriófago es que el fago causa una reorganización profunda de toda la síntesis de macromoléculas en las células huésped bacterianas. Apagando la transcripción de genes bacterianos, los fagos pueden aumentar la copia del gen diana, y por consiguiente, aumentar la producción del producto deseado.

En una forma de realización del sistema de superproducción presente, se proporcionan fagos λ con mutaciones ámbar que retrasan la lisis bacteriana (por ejemplo, mutaciones en Q y R) a una cepa de *E. coli*, designada Su^o, que carece del supresor responsable de corregir las mutaciones ámbar en el fago λ . Para obtener una cepa de *E. coli* no supresora (Su^o), se seleccionan clones Su^o de la población salvaje Su⁺. Preferiblemente, se inserta un marcador de selección en el ADN del fago, por ejemplo, resistencia a tetraciclina o ampicilina.

La selección de las cepas no supresoras (Su^o) de *E. coli*, por ejemplo, *E. coli* K 802 se llevó a cabo con fago λ cI₈₅₇Nam7Nam53 bla tet (de ahora en adelante λ bla N⁺). La cepa de *E. coli* C600 (λ bla N⁺) sirvió como fuente del fago. Este fago se obtuvo por inserción del plásmido pCV 11 (bla tet) en el sitio EcoRI de un vector con sitio único (EcoRI) que lleva una mutación ts en el gen represor (cI₈₅₇). Después se introdujeron dos mutaciones ámbar en el gen N del fago mediante recombinación *in vivo*.

Los clones se probaron para no lisogenicidad con fago λ clear. Además del fago λ bla N⁺, se utilizó el fago λ cI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} para buscar supresores.

Como se sabe, el mutante N⁺ del fago λ no es capaz de lisar las células huésped y está presente en las células en forma de plásmidos extremadamente inestables. Si las células huésped contienen un supresor, la mutación ámbar se corrige fenotípicamente, la proteína N se sintetiza y el fago se puede desarrollar líticamente. Esta diferencia en la viabilidad de las células Su⁺ y Su^o, infectadas por λ N⁺, se usa como base para la selección de revertientes Su^o que aparecen espontáneamente en la población celular de *E. coli* Su⁺. Su usó el fago λ con un plásmido insertado que introduce los marcadores de resistencia a ampicilina y tetraciclina en las células para prevenir que las células

ES 2 284 677 T3

no lisantes Su^o enmascaren la búsqueda de mutantes. El fago también contiene la mutación ts en el gen represor que permite el desarrollo lítico de dicho fago resultando en lisis celular.

Si el medio suplementado con ampicilina y tetraciclina se inocula con un cultivo Su⁺ tras su infección con fago λ bla N' con crecimiento posterior a 43°C, se deberían desarrollar en las placas células individuales libres de supresor que contienen el fago λ bla N' en forma de plásmido. Curando las células del fago, deberíamos obtener derivados Su^o de los cultivos parentales. El método se puede subdividir en diferentes fases.

1. Infección del cultivo con el fago λ bla N'

El cultivo de *E. coli* Su⁺ se cultivó en el medio M9 con maltosa a 37°C con agitación intensa hasta una densidad de 1-2 x 10⁸ células/ml. Las células se infectaron con el fago λ bla N' a una multiplicidad de 5-10 partículas por células y se incubaron durante 20 minutos a 20°C. Bajo las condiciones dadas, la eficiencia de la infección es de alrededor del 100%, además del grueso de las células Su⁺, el fago también infecta células Su^o individuales.

2. Selección de células libres de supresor que contienen el fago marcador

Tras la infección, las células se sembraron en medio de agar suplementado con tetraciclina a 12 γ /ml y ampicilina a 20 γ /ml, y se crecieron a 43°C. En 24 horas se desarrollaron colonias individuales, que se resembraron en medio de agar con antibióticos y se cultivaron a 37°C.

3. Cura de los clones seleccionados del fago λ

Dado que el fago λ N' en las células de *E. coli* Su^o está en forma de plásmidos extremadamente inestables, para curarlos del fago los clones seleccionados se sembraron en medio selectivo de agar sin antibióticos y se cultivaron a 37°C. El número de células que ha perdido el fago en el primer pase en el medio sin antibióticos ascendió al 12-35%. La selección de dichas células se llevó a cabo monitorizando la pérdida de resistencia a antibióticos y la adquisición de sensibilidad al fago λ clear.

4. Ensayo de células para represor

Se ensayó la capacidad del fago λ con mutaciones ámbar para formar placas en césped de clones curados. Los derivados isogénicos libres de represor de las cepas parentales de *E. coli* Su⁺ son clones en los que el fago λ bla N' no formó placas, el fago λ cl₈₅₇Q_{am117}R_{am54} produjo 1-3 x 10⁵ PFU/ml, y el fago λ cl₈₅₇ sin mutaciones en los genes Q y R produjo 1 x 10¹⁰ PFU/ml.

Utilizando este método, obtuvimos revertientes Su^o de *E. coli* K 802 Su⁺. Basado en el número de células en el momento de la infección y el número de revertiente Su^o entre ellos, la frecuencia de aparición de células libres de supresor fue de 3 x 10⁻⁷.

En una forma de realización preferida, el gen de interés se clona en pET-24a(+) bajo el control del promotor T7. Cualquier gen de interés se puede usar en la práctica de la invención reivindicada. Ejemplos particulares incluyen, pero no están limitados a la hormona de crecimiento humana, interferón, metionina amino peptidasa, la forma del FGFa humano de 134 aminoácidos, la forma del FGFa humano de 140 aminoácidos, la forma del FGFa humano de 146 aminoácidos, y la forma del FGFa humano de 155 aminoácidos. En una forma de realización alternativa, el gen de interés se puede clonar en un plásmido bacteriano y en un fago bajo el control de los promotores adecuados. En la forma de realización más preferida, el gen FGFah 155 sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 1) se clona en pET-24a(+) bajo el control del promotor T7. El promotor T7 sólo es reconocido por ARN polimerasa de T7 y no es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*. El plásmido obtenido con el gen FGFah 155 (FGFahp 155) se transformó en *E. coli* BL21 (DE3). Esta cepa contiene el gen de la ARN polimerasa de T7. El gen de la ARN polimerasa de T7 está bajo el control del promotor inducible lac UV5 para inducir la síntesis de la ARN polimerasa de T7 sólo cuando es necesaria ya que esta proteína es tóxica para las células de *E. coli*. La inducción del promotor lac se lleva a cabo añadiendo IPTG al medio nutriente. Para obtener la proteína FGFah 155, la cepa productora, que contiene el plásmido recombinante con el gen de FGFah 155, se cultiva en condiciones de aireación intensiva con una densidad celular de 5 x 10⁷ - 5 x 10⁹ células en 1 ml a una temperatura de 20-40°C. Se infecta entonces con el fago lambda con la mutación ts en el gen represor cI con una multiplicidad de 0.1 a 100 cuerpos de fago por célula y se continúa la incubación a 20-37°C durante 2-14 horas. Simultáneamente con el fago, se añade IPTG a una concentración de 1 mM.

El gen FGFah 155 codifica una proteína que contiene 155 residuos aminoácidos. Sin embargo, sólo se han podido aislar dos formas más cortas de FGFa a partir de muestras de tejidos. Las dos formas aisladas contienen 140 y 134 residuos aminoácidos. La forma de FGFa que contiene 140 aminoácidos se considera completa, mientras que la forma de FGFa que contiene 134 aminoácidos se considera que está truncada. No ha sido posible extraer la forma de FGFa que contiene 155 aminoácidos de muestras de tejidos. No se sabe si las isoformas más cortas ocurren como una función normal del procesamiento celular o como un artefacto que ocurre durante el procedimiento de aislamiento por proteasas específicas en el proceso de extracción del FGFa. Análisis por Western blot de la proteína producida de las moléculas aisladas de ADN recombinante para las tres formas del FGFa mostró altos niveles de expresión de las formas de 140 y 134 y bajos niveles de expresión de la forma de 155.

ES 2 284 677 T3

En una forma de realización preferida de la presente invención, el gen humano del factor de crecimiento de fibroblastos ácido codifica la forma de 155 aminoácidos de la proteína FGFa y es sintetizado químicamente (SEQ ID NO: 1). La secuencia de nucleótidos del gen de FGFa 155 se ha deducido en base a la secuencia de aminoácidos previamente descrita para FGFa 155 (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos del gen FGFa 155 sintetizado no difiere de aquellas previamente descritas como la de la secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de FGF de la SEQ ID NO: 3. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos preferida del gen FGFah difiere de aquellas previamente descritas. En una forma de realización preferida de la presente invención, el gen FGFah 155 se ha sintetizado químicamente usando los codones que son con mayor frecuencia utilizados por *E. coli* para proteínas bacterianas sintetizadas intensivamente. Las tablas del uso de codones para *E. coli* son bien conocidas y están disponibles. Ver, por ejemplo, <http://psyche.uthct.edu/shaun/Sblack/codonuse.html>. La síntesis química de los genes humanos del FGFa se llevó a cabo mediante métodos bien conocidos (Edge *et al.* (1983) *Nucleic Acids Research* 11 (18): 6419-6435).

Alternativamente, cualquier gen de interés se puede usar en la práctica de la presente invención incluyendo, pero no limitado a, ADN aislado de tejidos animales que codifica otras formas de la proteína FGFah conocidas para los expertos en la materia incluyendo las isoformas de 146, 140 y 134 y cualquier variante, derivados, o fragmentos de las mismas. También ejemplificados aquí están los genes que codifican la hormona del crecimiento humana, el interferón humano y la metionina amino peptidasa de *E. coli*.

La figura 1 muestra la secuencia completa de nucleótidos del gen FGFah 155, como se ha sintetizado por los inventores (SEQ ID NO: 1).

Los vectores de expresión y clonación típicamente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está conectado operativamente al gen de interés. Los promotores son secuencias no traducibles localizadas corriente arriba (5') al codón de inicio de un gen estructural (normalmente en un rango de 100-1000 pares de bases) que controlan la transcripción y traducción de secuencias particulares de ácidos nucleicos a los que están conectados operativamente. Tales promotores se dividen normalmente en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles incrementados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algunos cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Actualmente se conocen un gran número de promotores reconocidos por células huéspedes procariontas. El experto en la materia sabría cómo ligarlos al gen de interés utilizando los adaptadores o eslabones para proporcionar los sitios de restricción adecuados.

Un sistema de promotor preferido es el sistema del promotor del bacteriófago T7 de *E. coli*. El promotor del bacteriófago T7 de *E. coli* es muy específico y requiere la presencia de la ARN polimerasa de T7. La ARN polimerasa de T7 se puede proporcionar mediante transformación con un plásmido que exprese el gen de la ARN polimerasa de T7 o se puede proporcionar por inducción del gen de la polimerasa de T7 contenido en un lisógeno en la cepa huésped. El promotor T7 y la ARN polimerasa de T7 están comercialmente disponibles.

Transformación significa introducción de ADN en un organismo de modo que el ADN es capaz de replicarse, bien como un elemento extracromosomal o bien por integración en el cromosoma. La transformación de células procariontas se lleva a cabo usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, como tratamiento con CaCl₂ o electroporación.

La superproducción de proteínas recombinantes se alcanza cultivando la cepa productora en condiciones que ralentizan el desarrollo lítico del fago lambda. Tales condiciones incluyen temperatura de cultivo disminuida y uso de mutaciones ámbar en los genes tardíos del fago lambda como los genes Q y R.

Las proteínas recombinantes se acumulan en los medios de cultivo como proteínas solubles como resultado de la lisis de las células de la cepa productora por el fago lambda. La producción de proteína recombinante constituye generalmente el 20% de las proteínas solubles acumuladas en el medio de cultivo. Los restos celulares se retiran del medio de cultivo por centrifugación. Las proteínas recombinantes se pueden entonces purificar de las proteínas y polipéptidos contaminantes mediante procedimientos de purificación, que son bien conocidos para los expertos en la materia. Tales procedimientos incluyen, pero no están limitados a, fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, inmunoafinidad, SDS-PAGE, precipitación con sulfato amónico, y filtración en gel. En el caso de las proteínas FGFah, la proteína FGFah se aplicó a heparina sepharosa para obtener FGFah purificado.

Una descripción más detallada de la presente invención se proporciona abajo. Mientras que la forma de realización descrita representa una forma de realización preferida de la presente invención, se debe entender que los expertos en la materia producirán modificaciones sin separarse del espíritu de la invención. El alcance de la invención se determinará solamente para las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

65 Producción de FGFa 155 humano por un método dependiente de fago

Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con el plásmido pET24-155@rev (Figura 3), que contiene una copia del gen FGFa 155 que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano (155

ES 2 284 677 T3

aminoácidos). Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una única copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). En el plásmido pET-24a(+) (NOVAGEN) se insertó el gen FGFah 155 químicamente sintetizado (SEQ ID NO: 1) bajo el control del promotor T7 para producir el plásmido pET24-155@rev. La expresión del gen FGFah 155 empieza sólo tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) con pET24-155@rev se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB, que contiene 50 g/ml de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago cI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

El fago cI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. El medio de cultivo, que contiene la proteína FGFah 155 se aplicó a una columna de heparina sepharosa para obtener el FGFah 155 puro.

El medio de cultivo que contiene FGFah 155 se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturizantes y se tiñó con azul de Coomassie. En la figura 4 se compara un electroforegrama del medio de cultivo, que contiene la proteína FGFah 155, con proteína purificada FGFah. El carril 1 muestra 10 l del medio de cultivo. El carril 2 muestra 7 l de la proteína FGFah 155 purificada en heparina-sepharosa (0.45 g/l). El carril 3 muestra 14 l de un total de 80 l de FGFah purificada en HPLC. El carril no marcado en el extremo izquierdo contiene los marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech). La producción de proteína FGFah 155 en cultivos infectados con fago fue de alrededor del 20% de la proteína celular total. El peso molecular de FGFah 155 fue de 17,908 Dalton determinada mediante un densitómetro Image Master VDS (datos no mostrados).

El FGFA humano producido por el método divulgado arriba mostró actividad biológica basada en el ensayo de membrana de pollo (Ejemplo 6). Además, el FGFA humano purificado mostró bioactividad en un ensayo de proliferación basado en células utilizando fibroblastos BALB/c 3T3 (Linemeyer, Patente de EE UU No. 5401832). La estimulación semi-máxima de la proliferación celular ocurrió a una concentración de FGFA de 32 pg/ml. El FGFA 155 humano no purificado, contenido en el medio de cultivo bacteriano, también mostró actividad biológica en el ensayo en fibroblastos 3T3 que fue equivalente al FGFA purificado, indicando que el FGFA 155 se sintetizó inicialmente en bacterias como una proteína soluble, biológicamente activa.

Ejemplo 2

Producción de FGFA 134 humano por un método dependiente de fago

Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con el plásmido pET24-134@rev (Figura 5), que contiene una copia del gen sintetizado químicamente que codifica el FGFA humano (134 aminoácidos) (Figura 6; SEQ ID NO: 4). La secuencia de aminoácidos traducida se muestra en SEQ ID NO: 5. Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen de la forma de 134 aminoácidos del FGFA humano se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen de la forma de 134 aminoácidos del FGFA humano solo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET24-134@rev se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago cI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

El fago cI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. El medio de cultivo, que contiene la proteína FGFah 134 se aplicó a una columna de heparina sepharosa para obtener la proteína FGFah 134 pura.

ES 2 284 677 T3

Ejemplo 3

Producción de FGFa 140 humano por un método dependiente de fago

5 Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con el plásmido pET24-140@rev (Figura 7), que contiene una copia del gen sintetizado químicamente que codifica el FGFa humano (Figura 8; 140 aminoácidos) (SEQ ID NO: 6). La correspondiente proteína se muestra como SEQ ID NO: 7. Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen de la forma de 140 aminoácidos del FGFa humano se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen de la forma de 140 aminoácidos del FGFa humano solo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

15 Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET24-140@rev se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

20 El fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

25 Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. El medio de cultivo, que contiene la proteína FGFAh 140 se aplicó a una columna de heparina sepharosa para obtener el FGFAh 140 humano puro.

30 El FGFA 140 humano producido por el método divulgado arriba mostró actividad biológica basada en el ensayo de membrana de pollo (Ejemplo 6).

Ejemplo 4

Producción de FGFa 146 humano por un método dependiente de fago

35 Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con el plásmido pET24-146@rev, que contiene una copia del gen sintetizado químicamente que codifica el FGFA humano (140 aminoácidos) (no mostrado). Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen de la forma de 146 aminoácidos del FGFA humano se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen de la forma de 146 aminoácidos del FGFA humano solo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

45 Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET24-146@rev se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

50 El fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

55 Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. El medio de cultivo, que contiene la proteína FGFAh 146 se aplicó a una columna de heparina sepharosa para obtener el FGFAh 146 humano puro.

60 El FGFA 146 humano producido por el método divulgado arriba mostró actividad biológica basada en el ensayo de membrana de pollo (Ejemplo 6).

Ejemplo 5

Purificación de proteínas recombinantes FGFAh

65 El medio de cultivo que contiene una proteína FGFAh se diluye con un volumen de tampón KH_2PO_4 0.04 M, pH 7.0, y se aplica a una columna de heparina-sepharosa equilibrada con KH_2PO_4 0.02 M, pH 7.0. La velocidad de flujo se ajusta a 80 ml/hora. Tras la aplicación del medio de cultivo que contiene la proteína FGFAh, la columna se lava con tampón KH_2PO_4 0.02 M, pH 7.0. Después, la columna se lava con tampón KH_2PO_4 0.02 M, que contiene NaCl 0.6

ES 2 284 677 T3

M, pH 7.3. La elución se lleva a cabo utilizando tampón KH_2PO_4 0.02 M con NaCl 1.5 M, pH 7.5. Todos los pasos se llevan a cabo a 4°C.

Ejemplo 6

5

Un método para estudiar la influencia del FGF en la formación de nuevos vasos sanguíneos en la membrana corioalantoica (MCA) del embrión de pollo

10 El método para estudiar la angiogénesis en el modelo de embriones de pollo (Thomas *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 82:6409-6413) se adaptó para determinar los efectos de las proteínas recombinantes FGFah 155, 146 y 140 en angiogénesis comparado con factor de crecimiento de fibroblastos ácido puro derivado de cerebro. El factor de crecimiento de fibroblastos ácido puro derivado del cerebro es un potente mitógeno angiogénico de células endoteliales vasculares con homología de secuencia con la interleuquina.

15 Las cáscaras de embriones de pollo de tres días se esterilizaron con alcohol etílico. Las cáscaras y las cubiertas bajo las cáscaras se retiraron de la cámara de aire utilizando fórceps y los huevos se cubrieron con el fondo de una placa Petri de plástico de 35 mm. Los embriones se incubaron a 37°C durante 5-6 días. Al final de este período, se examinaron los embriones y se seleccionaron para experimentación los huevos con vasos sanguíneos de MCA bien desarrollados.

20

Discos de papel de filtro con gel depositado que contenía FGF se depositaron sobre MCA de huevos, con el gel hacia los vasos sanguíneos y se incubaron en un termostato a 37°C durante otros 3 días. El gel se preparó de la siguiente manera: se disolvió la cantidad probada de FGF en 30 l de medio de Eagle (solución 1); entonces se disolvieron 10 g de heparina en 30 l de medio de Eagle y se añadió agarosa al 2% (solución 2). Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones 1 y 2 y la mezcla obtenida se depositó en alícuotas de 60 l en discos de papel de filtro de 12 mm de diámetro.

25

Al cuarto día, los discos de papel de filtro se retiraron. Se inyectó leche de vaca enriquecida (10% de grasa de leche) bajo la MCA en una cantidad de alrededor de 1 ml o menos. El resultado fue de un fondo blanco contra el que los vasos de la MCA fueron fácilmente observables.

30

Los resultados de los experimentos se grabaron con una cámara de vídeo conjuntamente con un ordenador. Se evaluó la formación de nuevos vasos en la MCA bajo el efecto del FGF mediante los siguientes parámetros: naturaleza y dirección del crecimiento de los vasos, su cantidad y categoría (grande, mediano, pequeño), la presencia o ausencia de anastomosis etc. Estos datos se compararon con las muestras control que no fueron expuestas a FGF. Los vasos sanguíneos de embriones de pollo en el 14° día de desarrollo se trataron con FGF 155 producido por el método recombinante dependiente de fago descrito aquí y purificado con heparina-sepharosa como se ha descrito.

35

La aplicación de la proteína recombinante FGF 155 demostró la formación de vasos sanguíneos nuevos. En el cuarto día tras la aplicación de 1 g de FGF 155, los vasos eran fundamentalmente pequeños y mostraban crecimiento radial. Un aumento del FGF 155 hasta 3 g mostró el correspondiente aumento en tamaño de los vasos sanguíneos. Se observaron vasos medianos con crecimiento radial. Un mayor aumento de hasta 4 g de FGF 155 aplicado mostró el desarrollo de vasos sanguíneos grandes, medianos y pequeños 4 días tras la aplicación comparados con el control.

40

Ejemplo 7

Producción hormona de crecimiento humana por un método dependiente de fago

50 Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con un plásmido que contiene una copia de un gen sintetizado químicamente que codifica la hormona de crecimiento humana (SEQ ID NO: 8). La secuencia traducida de aminoácidos se muestra como SEQ ID NO: 9. Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al.* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen de la hormona de crecimiento humana se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen de la hormona de crecimiento humana sólo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

55

Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago $\text{cI}_{857}\text{Q}_{\text{am}117}\text{R}_{\text{am}54}$ a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

60

El fago $\text{cI}_{857}\text{Q}_{\text{am}117}\text{R}_{\text{am}54}$ se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

65

ES 2 284 677 T3

Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. La proteína de la hormona de crecimiento humana se purificó mediante cromatografía en columna por métodos conocidos para los expertos en la materia para obtener hormona de crecimiento humana pura. La hormona del crecimiento humana purificada fue biológicamente activa cuando se ensayó en un bio-ensayo basado en células, que utiliza células de linfoma Nb2 (Gout P.W., Cancer Research 40:2433-2436, 1980). La concentración de la hormona del crecimiento humana que produjo estimulación semi-máxima sobre la proliferación de células N2b fue de 125 pg/ml.

Ejemplo 8

Producción de interferón-2b humano por un método dependiente de fago

Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con el plásmido pET24-inf@rev (Figura 9), que contiene una copia del gen sintetizado químicamente que codifica el interferón-2 humano (Figura 10; SEQ ID NO: 10). La secuencia de aminoácidos traducida se muestra como SEQ ID NO: 11. Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen del interferón humano se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen del interferón sólo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET24-inf@rev se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

El fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. El interferón se purificó mediante cromatografía en columna por métodos conocidos para los expertos en la materia para obtener interferón puro.

El interferón producido por el método divulgado tenía actividad biológica en el ensayo antiviral del interferón llevado a cabo en células de riñón bovinas infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (Aebersold P., Methods in Enzymology 119:579-592, 1986). En este ensayo el interferón alpha 2b tiene una potencia biológica de 1.81×10^8 Unidades Internacionales (IU) por mg de proteína. En este ensayo antiviral el interferón alpha 2b contenido en el medio de cultivo antes de la purificación tenía una potencia equivalente a la del interferón purificado, indicando que el interferón alpha 2b es inicialmente sintetizado en bacterias como una proteína soluble, biológicamente activa.

Ejemplo 9

Producción de la metionina amino peptidasa de *E. coli* por un método dependiente de fago

Cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformaron con un plásmido que contiene una copia del gen sintetizado químicamente que codifica la metionina amino peptidasa de *E. coli*. Los cultivos de BL21 (DE3) contienen una sola copia del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible lac UV5 en el genoma bacteriano (Studier *et al* (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130). El gen de la metionina amino peptidasa de *E. coli* se insertó en el plásmido pET24a(+) (NOVAGEN) bajo el control del promotor T7. La expresión del gen de la metionina amino peptidasa de *E. coli* sólo empieza tras la aparición de la polimerasa de T7 en las células que está mediada a través de la inducción del promotor lac UV5 por IPTG.

Los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados se hicieron crecer con agitación a 37°C en medio LB que contiene 50 g/l de kanamicina, hasta una densidad de 2×10^8 células/ml. Las células se infectaron entonces con el fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ a una multiplicidad de alrededor de 10 cuerpos de fago por célula bacteriana y se cultivaron con agitación a 21°C durante unas 14 horas. Simultáneamente con el fago, se añadió al medio IPTG 1 mM.

El fago $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$ se preparó de cultivos lisogénicos de *E. coli* RLMI, que se cultivaron en medio LB a 30°C con aireación intensiva hasta una densidad aproximada de 1×10^8 células/ml. El cultivo lisogénico se calentó a 43°C y se incubó durante 20 minutos para inactivar el represor cI. La temperatura se bajó entonces a 37°C y tras 60-70 minutos las células bacterianas sufrieron lisis, con los fagos formándose a $1-2 \times 10^{10}$ PFU/ml.

Tras incubación de las células infectadas con fago durante 14 horas, los restos celulares se retiraron del medio de cultivo por centrifugación. La metionina amino peptidasa de *E. coli* se purificó mediante cromatografía en columna por métodos conocidos para los expertos en la materia para obtener metionina amino peptidasa de *E. coli* pura.

Ejemplo 10

Análisis en gel de las proteínas recombinantes producidas por el método dependiente de fago

5 Medios de cultivo que contienen la forma de 134 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 140 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 155 aminoácidos del FGFa humano, hormona de crecimiento humana, interferón, y metionina amino peptidasa se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en condiciones des-naturalizantes y se tiñeron con azul de Coomassie. En la Figura 11 se compara un electroforegrama de los medios de cultivo que contienen la forma de 134 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 140 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 155 aminoácidos del FGFa humano, hormona de crecimiento humana, interferón, y metionina amino peptidasa con los marcadores de peso molecular. El carril 2 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene la forma de 134 aminoácidos de FGFa humano. El carril 3 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene la forma de 140 aminoácidos de FGFa humano. El carril 4 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene interferón recombinante. El carril 5 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene la forma de 155 aminoácidos de FGFa humano. El carril 6 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene la hormona de crecimiento humana recombinante. El carril 7 muestra 30 l del medio de cultivo que contiene la metionina amino peptidasa recombinante. El carril 1 muestra 2 g de cada uno de los marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech). Desde arriba, los marcadores de peso molecular son: 94,000; 67,000; 43,000; 30,000; 20,100; 14,400.

20 La cuantificación de las cantidades de la forma de 134 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 140 aminoácidos del FGFa humano, la forma de 155 aminoácidos del FGFa humano, hormona de crecimiento humana, interferón, y metionina amino peptidasa en una mezcla se logró mediante escáner de las bandas de proteínas teñidas en un gel de poliacrilamida con un densitómetro Image Master VDS (Pharmacia Biotech). La producción de proteínas recombinantes en los cultivos infectados con fagos fue de alrededor del 20% de la proteína celular total.

25 Se comparó un electroforegrama que contenía las proteínas recombinantes purificadas FGFa humana 134, FGFah 140, FGFah 146, interferón, FGFah 155 y metionina amino peptidasa (Figura 12). El carril 2 muestra 5 g de la proteína purificada FGFa 134. El carril 3 muestra 5 g de la proteína purificada FGFa 140. El carril 4 muestra 5 g de la forma de 146 aminoácidos del FGFa humano purificado. La producción de la forma de 146 aminoácidos del FGFa humano en cultivos infectados por fagos fue de alrededor del 20% de la proteína celular total. El carril 5 muestra 5 g de interferón purificado. El carril 6 muestra 5 g de la proteína FGFa 155. El carril 7 muestra 5 g de la metionina amino peptidasa de *E. coli* purificada. Los carriles 1 y 8 muestran 2 g de cada marcador de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech).

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína biológicamente activa, que comprende:

- 5 a) hacer crecer una cepa de *E. coli* capaz de expresar el gen de la ARN polimerasa de T7 mediante la adición de un inductor,
- 10 b) transformar la cepa obtenida en el paso a) con un plásmido que tiene al menos una copia de un gen expresable que codifica una proteína biológicamente activa, conectado operativamente al promotor de la polimerasa de T7
- 15 c) infectar la cepa obtenida en el paso b) con un bacteriófago que media lisis retardada, con una mutación sensible a temperatura cI_{857} y una mutación en al menos un gen seleccionado de entre N, Q, y R, e incubar la cepa de *E. coli* infectada en un medio de cultivo que contiene el inductor para expresar el gen de la polimerasa de T7, y
- d) cultivar la cepa obtenida en el paso c) en unas condiciones de cultivo que inducen crecimiento lítico de dichas células sin lisis hasta que se alcanza un nivel deseado de producción de dicha proteína.

20 2. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde dicho bacteriófago es un $cI_{857}Q_{am117}R_{am54}$.

3. El método de acuerdo a las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el bacteriófago introducido en el paso c) se prepara siguiendo los pasos de:

- 25 a) Hacer crecer una primera cepa de células de *E. coli*, que hospedan dicho bacteriófago,
- b) ajustar la temperatura para producir lisis de la cepa obtenida en el paso a) y la liberación del bacteriófago.

30 4. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha proteína se produce como una proteína soluble, biológicamente activa a una concentración mayor de 100 microgramos/ml.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cepa de *E. coli* produce un supresor para reparar las mutaciones ámbar.

35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa de *E. coli* carece de un supresor para la reparación de la mutaciones ámbar.

40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el bacteriófago que infecta se proporciona a una multiplicidad de infección en un rango de entre alrededor de 1 a alrededor de 100.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el bacteriófago que infecta se proporciona a una multiplicidad de infección en un rango de entre alrededor de 10 a alrededor de 25.

45 9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la lisis retardada mediada por bacteriófago de la cepa de *E. coli* se retrasa a multiplicidades de infección más altas relativa a multiplicidades de infección más bajas.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el gen expresable codifica un factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano.

50 11. El método de la reivindicación 10, en donde el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 134 aminoácidos.

55 12. El método de la reivindicación 10, en donde el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 140 aminoácidos.

13. El método de la reivindicación 10, en donde el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 146 aminoácidos.

60 14. El método de la reivindicación 10, en donde el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano contiene 155 aminoácidos.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano tiene la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1.

65 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el gen expresable codifica la hormona de crecimiento humana.

ES 2 284 677 T3

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el gen expresable codifica un interferón humano.

5 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el gen expresable codifica la metionina amino peptidasa de *E. coli*.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el promotor inducible es un promotor lacUV5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 284 677 T3

| | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FGF fr HUMECGFB | TTC | GCC | CTG | ACC | AAG | AAT | CTG | CCT | CCA |
| FGFah 155 | TTT | GCG | TTA | ACG | AAA | AAC | CTT | CCG | CCC |
| N° aminoácido | 009 | 011 | 012 | 013 | 015 | 017 | 018 | 019 | 020 |
| | Phe | Ala | Leu | Thr | Lys | Asn | Leu | Pro | Pro |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | AAG | AAG | AAA | CTC | CTC | TGT | AGC | GGG | GGC |
| FGFah 155 | AAA | AAA | AAG | CTT | CTT | TGC | AGT | GGA | GGA |
| N° aminoácido | 024 | 025 | 027 | 028 | 029 | 031 | 032 | 034 | 035 |
| | Lys | Lys | Lys | Leu | Leu | Cys | Ser | Gly | Gly |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | AGG | ATC | CTT | CCG | GTG | ACA | AGG | GAC | AGG |
| FGFah 155 | CGA | ATT | CTG | CCA | GTA | ACT | CGC | GAT | CGC |
| N° aminoácido | 039 | 040 | 041 | 042 | 046 | 049 | 050 | 051 | 052 |
| | Arg | Ile | Leu | Pro | Val | Thr | Arg | Asp | Arg |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | AGC | CAG | AGT | GCG | GTG | GGG | GTG | ATA | AGT |
| FGFah 155 | TCC | CAA | TCG | GCC | GTT | GGA | GTC | ATC | TCG |
| N° aminoácido | 053 | 060 | 062 | 063 | 066 | 067 | 069 | 071 | 073 |
| | Ser | Gln | Ser | Ala | Val | Gly | Val | Ile | Ser |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | ACC | TTG | GAC | TTA | TAC | ACA | CCA | AAT | GAG |
| FGFah 155 | ACG | CTT | GAT | CTG | TAT | ACG | CCT | AAC | GAA |
| N° aminoácido | 074 | 080 | 085 | 088 | 089 | 093 | 094 | 095 | 096 |
| | Thr | Leu | Asp | Leu | Tyr | Thr | Pro | Asn | Glu |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | TGT | TTC | CTG | AGG | CTG | GAG | GAG | ACC | TAT |
| FGFah 155 | TGC | TTT | CTA | AGA | CTA | GAA | GAA | ACG | TAC |
| N° aminoácido | 098 | 100 | 101 | 103 | 104 | 105 | 106 | 111 | 112 |
| | Cys | Phe | Leu | Arg | Leu | Glu | Glu | Thr | Tyr |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | TCC | AAG | AAG | AAT | GTT | CTC | AAG | AAG | GGG |
| FGFah 155 | TCG | AAA | AAA | AAC | GTA | CTT | AAA | AAA | GGT |
| N° aminoácido | 114 | 115 | 116 | 121 | 124 | 126 | 127 | 128 | 130 |
| | Ser | Lys | Lys | Asn | Val | Leu | Lys | Lys | Gly |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | AGC | TGC | AAA | CGC | GGT | CCT | CAG | AAA | GCA |
| FGFah 155 | TCC | TGT | AAG | CGT | GGA | CCA | CAA | AAG | GCT |
| N° aminoácido | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 142 | 143 | 144 |
| | Ser | Cys | Lys | Arg | Gly | Pro | Gln | Lys | Ala |
| | | | | | | | | | |
| FGF fr HUMECGFB | TTT | CTC | CCC | CTG | GTC | TCT | TCT | GAT | |
| FGFah 155 | TTC | CTG | CCA | CTC | GTG | AGC | TCC | GAC | |
| N° aminoácido | 147 | 148 | 149 | 150 | 152 | 153 | 154 | 155 | |
| | Phe | Leu | Pro | Leu | Val | Ser | Ser | Asp | |

MODIFICACIÓN DE LOS CODONES EN LA MOLÉCULA DE FGFha 155.

FGF fr HUMECGFB-LA SECUENCIA DEL GENE BANK (EN NCBI), FGFah 155-LA SECUENCIA SINTETIZADA POR LOS AUTORES DE LA INVENCION

FIG. 2

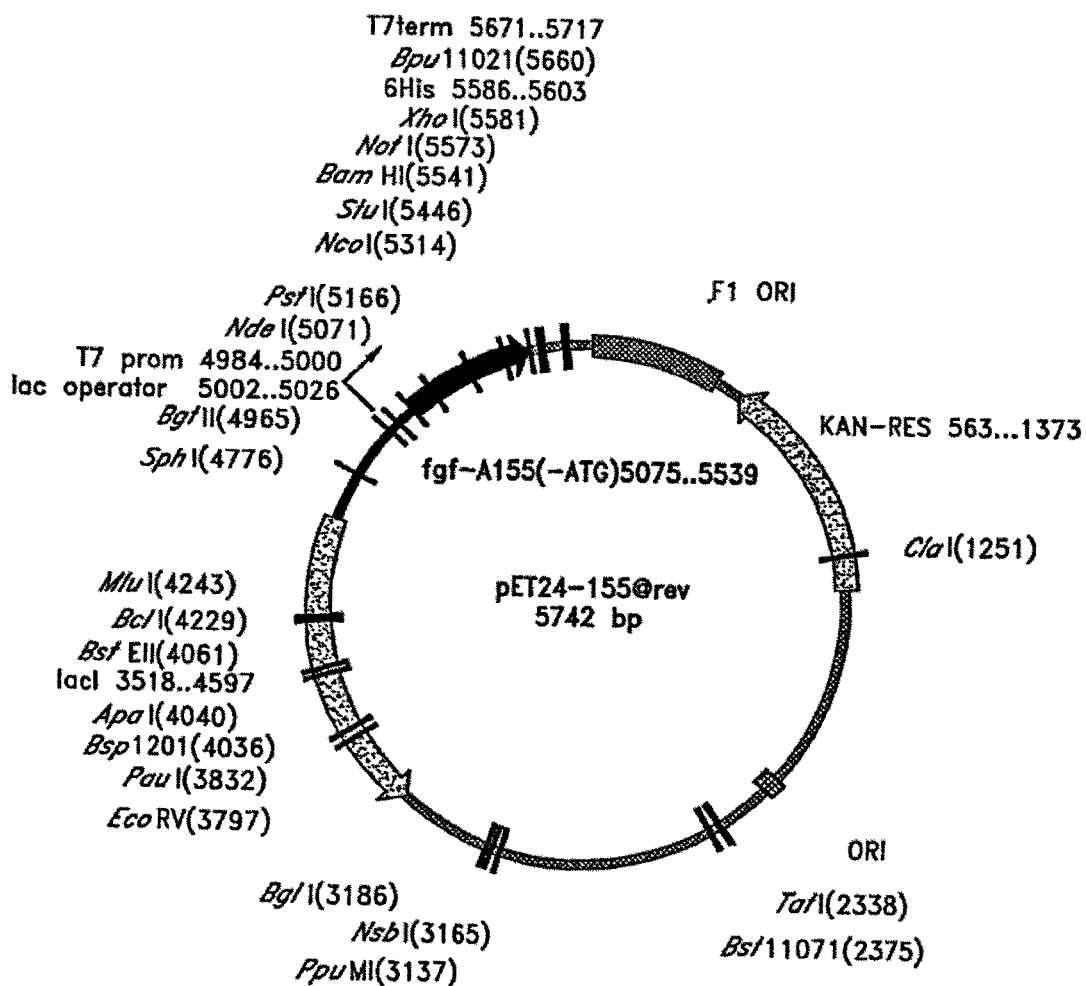


FIG. 3

FGF 155 PURIFICADO POR HPLC (23-8-00)



CARRIL 1: 10 μ l DE MEDIO CONDICIONADO

2: 7 μ l DE PURIFICADO POR HEPARINA-SEFAROSA (0.45 μ g/ μ l)

3: 14 μ l de 80 μ l DE PURIFICADO POR HPLC

FIG. 4

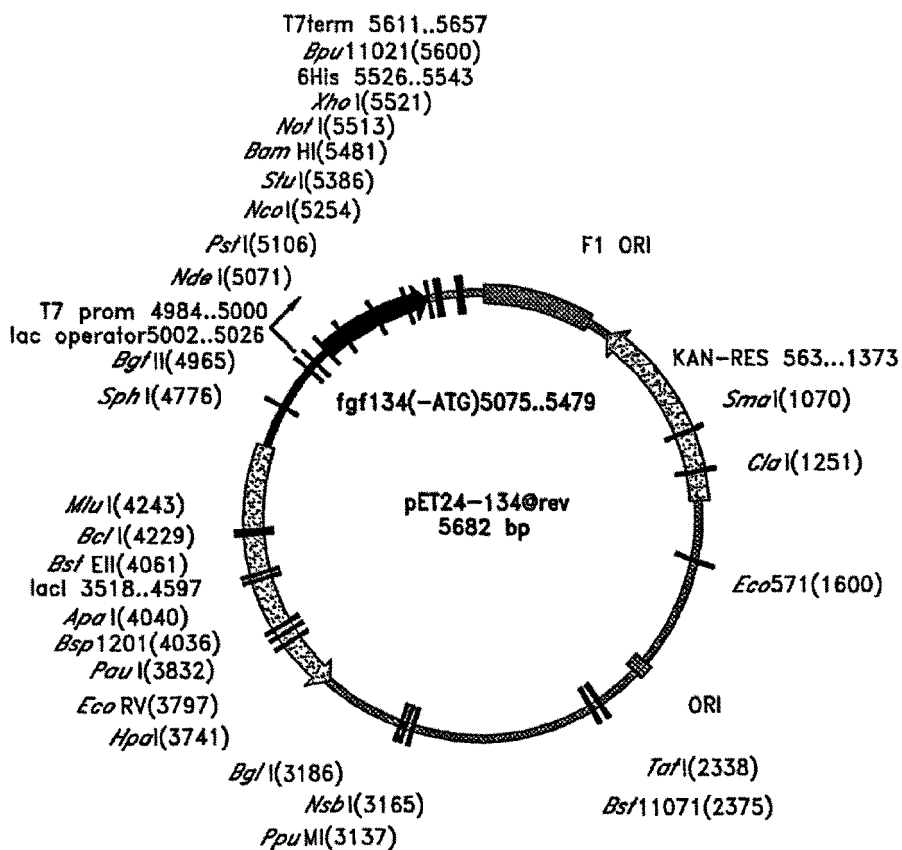


FIG. 5

ES 2 284 677 T3

```

          BsaBI
          -----
          BsaBI
          -----
          BglIII      VspI      BfmI      MbiI      XbaI
4951  GCGTAGAGGATCGAGAGGTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCA  CTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTAGAAATAA
      CGCATCTCCTAGCTCTAGGCTAGGGCGCTTAATATGCTGAGT  GATATCCDCTTAACACTCGCCTATTGTTAAGGGGAGATCTTTATT

+2      MetAsnTyrLysLys  ProLysLeuLeuTyrCysSerAsnGlyGlyRhoPheLeuArgII
      -----
      NdeI      HindIII      BfmI      EcoRI
5041  TTTTGTTAACITTTAAGAAGCGATATACATATGAATTACAAAA  ACCCAAGCTTCTTTACTGCAGTAACGGAGGACACTTCTCGGAT
      AAACAATTTGAAATCTCTCTATATGTATACITTAATGTTTT  TGGGTTGGAAGAAATGAOCTCATTGCTCTCTGTGAAGGACGCTTA

+2  eLeuProAspGlyThrValAspGlyThrArgAspArgSerAspGln  HisIleGlnLeuGlnLeuSerAlaGluSerValGlyGluValty
      -----
      EcoRI      NruI      PvuII      XmaIII
5131  TCTGCCAGATGGCACAGTAGATGGGACTCGGATCGCTCGACCA  GCACATTCAGCTGCAACTCTGGCCGAAAGCGTTGGAGAGGTCTA
      AGCAGCTTACCGTGTCTACCTCGAGCGTAGCGAGGCTGGT  CGTGTATGTCGACGTTGAGAGCCGGCTTTCGCAACTCTCCAGAT

+2  rIleLysSerThrGluThrGlyGlnTyrLeuAlaMetAspThrAsp  GlyLeuLeuTyrGlySerGlnThrProAsnGluGluCysLeuPh
      -----
      HindII      RsaI      StyI
      HincII      MspI  Csp6I      NcoI      MvaI269I
5221  TATCAAGTCGACGAGACTGGCCAGTACCTTGCCATGGACACCGA  TGGGCTTCTGTATGGCTCACAGACGCTTAACGAAGATGCTTGT
      ATAGTTCAGCTGCCCTCTGACCGGTCATGGACGGTAOCTGTGGCT  ACCCGAAGACATACCGAGTGTCTGGGGATTGCTTCTTACGAACAA

+2  eLeuGluArgLeuGluGluAsnHisTyrAsnThrTyrIleSerLys  LysHisAlaGluLysAsnTrpPheValGlyLeuLysLysAsnGI
      -----
      XbaI      Csp6I      StuI
5311  TCTAGAAAGACTAGAAGAAAACCATTACACAGTACATATCGRA  AAAACATGCAGAGAAGAACTGGTTTGTAGGCCTTMAAAAAATGG
      AGATCTTTCGATCTCTTTGGTAATGTGTGCAATATAGCTT  TTTGTACGTCCTCTCTTGNCCAAACATCCGGAATTTTTTAAOC

+2  ySerCysLysArgGlyProArgThrHisTyrGlyGlnLysAlaIle  LeuPheLeuProLeuProValSerSerAsp***
      -----
      MspI      Ecl136II      BamHIEcoRI
5401  TTCTGTAAGCGTGGACCACGGACTCACTATGGCCAAAAGGCTAT  CTTGTCTCTGCCACTACCAAGGCTCCGACTAAGGATCCGAAT
      AAGGACATTCGACCTGGTGGCTGAGTGTACCGGTTTTCCGATA  GAACAAGGACGGTGTATGGTCACTCGAGGCTGATTCCTAGGCTTAA

      SacI  Sali
      EcoRI  HindII      XmaIII  XhoI
      Ecl136IINHincIINHindIII  NotI  AvaI
5491  CGAGCTCCGTCGACAGCTTGGCGCCACTCGAGCACCCACCACC  ACCACCACTGAGATCCGGCTCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTG
      GCTCGAGGCAGCTGTTCGAACGCCGCGTAGCTGCTGGTGGTGG  TGGTGGTACTCTAGCCGAGATGTTTCCGGCTTCTCTCGAC
  
```

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS Y DE AMINOÁCIDOS PARA UN FGF HUMANO (134 AMINOÁCIDOS) SINTETIZADO QUÍMICAMENTE

FIG. 6

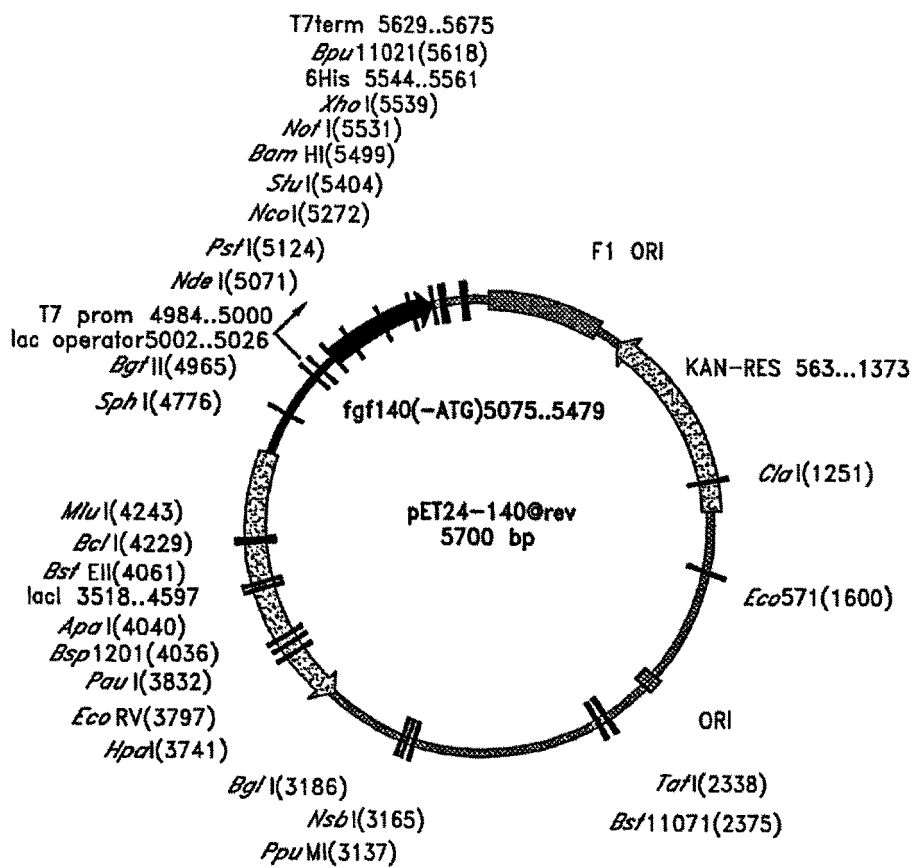


FIG. 7

ES 2 284 677 T3

| | | | | | |
|------|--|--|--|----------|--------|
| | BsaBI ----- BsaBI ----- BglII | VspI | BfmI | MbiI | XbaI |
| 4951 | CGGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCGCGAAATTAATACGACTCA | | CTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCGCCCTAGAAATAA | | |
| | CGCATCTCTAGCTCTAGAGCTAGGGCGCTTAAATTATGCTGAGT | | GATATCCCTTAACACTCGCCTATTGTTAAGGGGAGATCTTTATT | | |
| +2 | | MetPheAsnLeuPro | ProGlyAsnTyrLysLysProLysLeuLeuTyrCysSerAsnGI | | |
| | | | SmaI | | PstI |
| | | NdeI | AvaI | HindIII | BfmI |
| 5041 | TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTTAACTTCC | | GCCCGGGAATTACAAAAACCAAGCTTCTTTACTGCAGTAACGG | | |
| | AAARCAAAATTGAAATCTTCTCTATATGTATACAATTGAAGG | | CGGGCCCTAATGTTTTTTGGGTTCGAAGAAATGACGTCATTGCC | | |
| +2 | yGlyHisPheLeuArgIleLeu | ProAspGlyThrValAspGlyThr | ArgAspArgSerAspGlnHisIleGlnLeuGlnLeuSerAlaGI | | |
| | | | PvuI | | |
| | EcoRI | | NruI | PvuII | XmaIII |
| 5131 | AGGCACTTCTCGCAATTCGCCAGATGGCACAGTAGATGGGAC | | TCGCGATCGCTCCGACCAGCACATTAGCTGCAACTCTGGCCGA | | |
| | TCCGTGAGAGACCGCTTAAGACGGCTACCGGTGTCATCACTTCG | | AGCGCTAGCGAGGCTGGTGTGTAGTGTGAGGTTGAGGCCGGCT | | |
| +2 | uSerValGlyGluValTyrIleLysSerThrGluThrGlyGlnTyr | LeuAlaMetAspThrAspGlyLeuLeuTyrGlySerGlnThrPr | | | |
| | | SalI | | | |
| | | HindII | RsaI | StyI | |
| | | HincII | MlsI Csp6I | NcoI | |
| 5221 | AAGCCTTGGAGAGGCTATATCAAGTCGACCGGAGACTGGCCGTA | | CCTTGCATGGACCCGATGGCTTCTGTATGGCTCACAGCCGC | | |
| | TTCCGAACCTTCCAGATATAGTTCCAGCTGGCTCTGACCGGTGAT | | GGAACGGTACTGTGGCTACCCGAGACATACCGAGTGTCTCGCG | | |
| +2 | oAsnGluGluCysLeuPheLeuGluArgLeuGluGluAsnHisTyr | AsnThrTyrIleSerLysLysHisAlaGluLysAsnTrpPheVa | | | |
| | | | RsaI | | |
| | Hva1269I | XbaI | Csp6I | | |
| 5311 | TAACGAAGAAATGCTTGTCTAGAAAGACTAGAAAGAAACCTTA | | CRACAGGTACATATCGAAAAACATGCAGACAGAACTGGTTTGT | | |
| | ATTGCTTCTACGAAACAAGATCTTCTGATCTCTTTTGGTAAT | | GTGTGCAATGATAGCTTTTTTGTACGCTCTCTCTGACCAACA | | |
| +2 | lGlyLeuLysLysAsnGlySerCysLysArgGlyProArgThrHis | TyrGlyGlnLysAlaIleLeuPheLeuProLeuProValSerSe | | | |
| | | | SacI | | |
| | StuI | | MlsI | Ecl136II | |
| 5401 | AGGCCTTAAAAAATGGTTCCTGTAAGCGTGGACCCGGACTCA | | CTATGGCCAAAAGGCTATCTTGTCTCCTGCCACTACCAGTACGCTC | | |
| | TCCGAAATTTTTTTACCAAGGCATTTCGCACTGGTGTCTGAGT | | GATACCGGTTTTCCGATAGAACAGGACGGTGAATGGTCACTCGAG | | |
| +2 | rAsp*** | | | | |
| | | SalI | | | |
| | EcoRI | SacI | HindII | XmaIII | XhoI |
| | BamHI | Ecl136II | HincII | HindIII | NotI |
| | | | | AvaI | |
| 5491 | CGACTAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCG | | CACTGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAAC | | |
| | GCTGATCTCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTCGAACCCGGC | | GTGAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT | | |

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS Y DE AMINOÁCIDOS PARA UN FGF HUMANO (140 AMINOÁCIDOS) SINTETIZADO QUÍMICAMENTE

FIG. 8

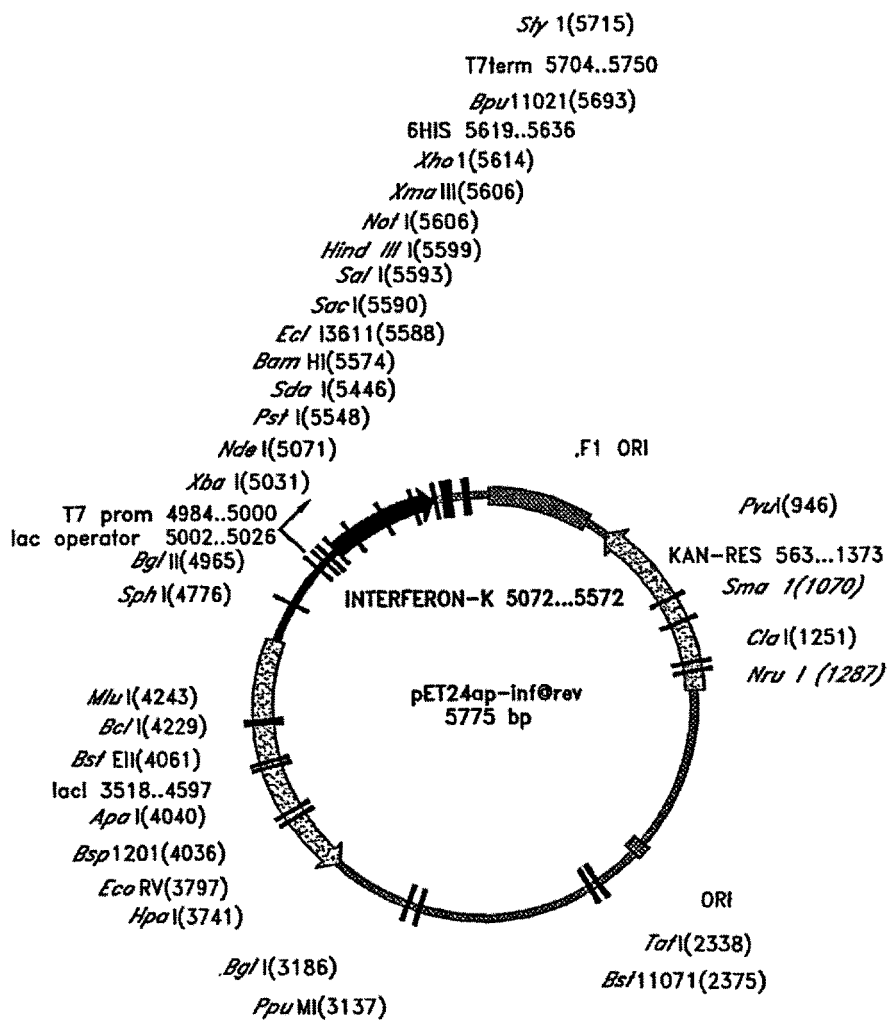
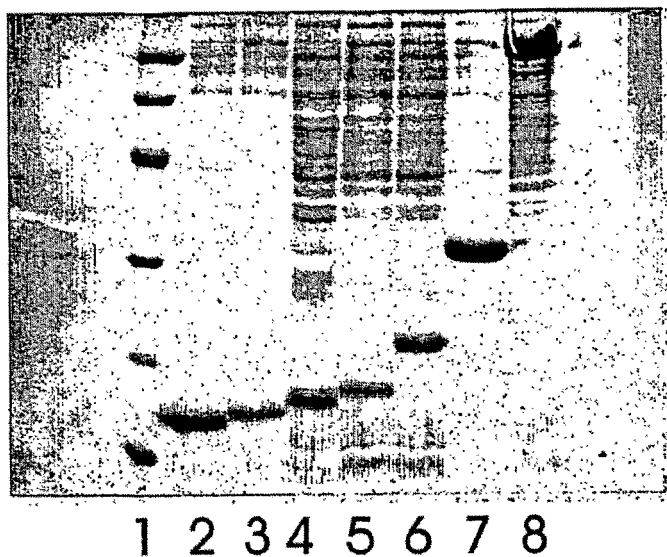


FIG. 9

| | | | |
|------|-----------------------------|------------------------|---|
| | | BpI ----- | |
| 2971 | GGGGCGTGA | CTCCGGTTTCCAGACTTTACGA | AACCGGAAACC GAAGACCA |
| | CCCCGGACTGAAGGGCAAAGGTCTGA | AATGCTTTGTGCCCTTGG | CTCTGGTAAAGTACAACAACGAGTCCAGCGCTGCAAAACGGTCGT |
| | | | PpuMI ----- EcoO109I ----- DraII ----- AvaII ----- |
| 3061 | GCAGTCGCTTCAAGTTCCGCTCGG | TTCGGTATTCATTCTGCTA | ACCAGTAAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGTCCCTCAACGACAG |
| | CGTCAGCGAAGTGCACGGCGGCA | TADCCACTAAGTAAGACGAT | TGGTCATTCGCTTGGGGCGGTCCGATCGGCCACGAGTTCGCTGT |
| | | BsaBI ----- | |
| | NsbI ----- | BglII ----- | VspI ----- |
| | BfmI ----- | MbiI ----- | |
| 3151 | GAGCAGATCATGGCCACCCGTCGGG | CCGAGATCTCGATCCCG | CGAATTAATACCACTCACTATAGGGAA |
| | CTCGCTAGTACGGTGGCCACCCCGGGT | CAGAGCTAGGGC | GCTTTAATATCTGAGTGTATAACCTTAACACTCGGCTATTGT |
| | | | GATATAT promoter |
| +2 | | | MetAlaGluGlyGluIleThrThrPheThrAlaLeuThrG1 HpaI ----- HindII ----- HincII ----- |
| | XbaI ----- | NdeI ----- | Eco57I ----- |
| 3241 | ATTCCCTCTAGAATTAATTTGTTAACT | TTAAGAGGAGATAT | ACATATGGCTGAAGGGGAATCACCACCTTTACAGGTTACGGA |
| | TAAGGGAGATCTTTATTAACAATTAAT | TCTTCTCTATA | TGTATACCGACTTCCCTTATGTTGGTGGAAATGTGCAATTCGCT |
| +2 | | | uLysPheAsnLeuProProGlyAsnTyrLysLysProLysLeuLeu TyrCysSerAsnGlyGlyHisPheLeuArgIleLeuProAspG1 SmaI ----- PstI ----- AvaI ----- HindIII ----- BfaI ----- EcoRI ----- |
| 3331 | GAAATTAACCTTCCGCCCCGGATTCA | AAAAAACCAGCTCT | TTACTGCAGTACGGGAGCACCTTCCCGGATTCCTGCCAGATGG |
| | CTTTAAATTGAAGGGGGCCCTAATG | TTTTTGGGTGGAAGA | AATGACGCTATTGCTCCTGTGAAAGGAGCTTAAGACGGTCTACC |
| +2 | | | yThrValAspGlyThrArgAspArgSerAspGlnHisIleGlnLeu GlnLeuSerAlaGluSerValGlyGluValTyrIleLysSerTh Sali ----- HindII ----- HincII ----- |
| | PvuI ----- | XbaIII ----- | |
| | NruI ----- | PvuII ----- | CfrI ----- |
| 3421 | CACAGTAGATGGGACTCGGGATCGCT | CCGACCAGCATTTCAGCT | GCAACTCTGGCCGAAGCGTTGGAGGCTATATCAAGTCGAC |
| | GTGTCACTACCCCTGAGCGCTAGCG | GGCTGGTGTAAAGTGA | CGTTGAGAGCGGGCTTCCGCAACCTCTCCAGATATAGTTCAAGCTG |
| +2 | | | rGluThrGlyGlnTyrLeuAlaMetAspThrAspGlyLeuLeuTyr GlySerGlnThrProAsnGluGluCysLeuPheLeuGluArgLe Hisi RsaI StyI ----- CfrI Csp6I NcoI ----- AcyI ----- Hval269I ----- XbaI ----- |
| 3511 | CGAGACTGGCCAGTACCTGCCATGG | ACCCGATGGCCTTCTGA | TGGCTCACAGAGCCCTAACGAAATGCTTGTCTTAGAAGACT |
| | CCCTGACCCGCTATGGACGGTACCT | GTGGCTACCCGAAAGCAT | ACCGAGTGTCTCCGATTCCTTCTTACGAACAAGATCTTTCTGA |
| | BsaAI ----- | | |

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS Y DE AMINOÁCIDOS PARA INTERFERON α-2B
SINTETIZADO QUÍMICAMENTE

FIG. 10



ELECTROFOREGRAMA

1-KIT DE PESOS MOLECULARES (94000, 67000, 43000, 30000, 20100,14400)

MEDIOS DE CULTIVO, CONTENIENDO:

2-FGFah 134 (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

3-FGFah 140 (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

4-IFNα2B (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

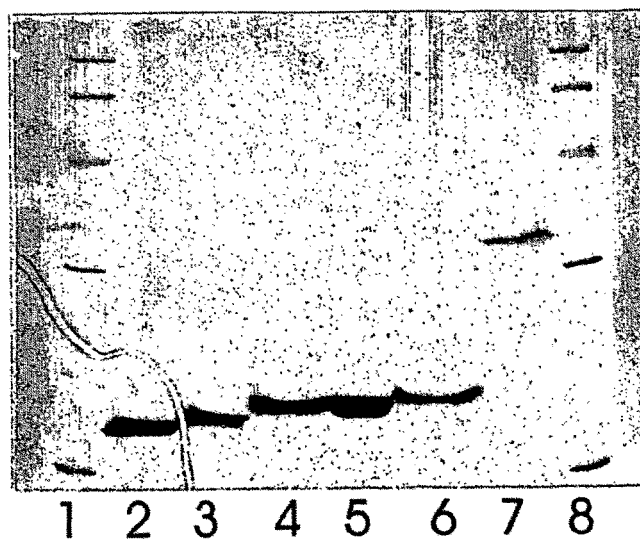
5-FGFah 155 (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

6-HGH (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

7-MAP (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

8-βGALACTOSIDASA DE E. COLI (40μl DE MEDIO DE CULTIVO)

FIG.11



ELECTROFOREGRAMA DE PRODUCTOS PURIFICADOS:

1-KIT DE PESOS MOLECULARES (94000, 67000, 43000,
30000, 20100, 14400)

2-FGFah 134

3-FGFah 140

4-FGFah 146

5-IFN α 2b

6-FGFah 155

7-MAP

8-KIT DE PESOS MOLECULARES

FIG. 12

ES 2 284 677 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Phage Biotechnology Corporation
- 5 <120> SUPERPRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS DEPENDIENTE DE FAGOS
- <130> PHAGE.006VPC
- <150> 09/318,288
- 10 <151> 1999-05-25
- <160> 11
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- 15 <211> 630
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Esta secuencia se sintetizó químicamente basada en la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos ácido humano (155 aminoácidos) usando codones que se usan en proteínas altamente expresadas en *E. coli*.
- 25 <221> CDS
- <222> (122)...(590)
- <400> 1

30
gcgtagagga tcgagatctc gatccccgca aattaatacg actcactata ggggaattgt 60
gagcggataa caattcccct ctagaataaa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca 120
t atg gct gaa ggg gaa atc acc acc ttt aca gcg tta acg gag aaa ttt 169
Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
35 1 5 10 15

aac ctt ccg ccc ggg aat tac aaà aaa ccc aag ctt ctt tac tgc agt 217
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
40 20 25 30

aac gga gga cac ttc ctg cga att ctg cca gat ggc aca gta gat ggg 265
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
45 35 40 45

act cgc gat cgc tcc gac cag cac att cag ctg caa ctc tcg gcc gaa 313
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 50 55 60

agc gtt gga gag gtc tat atc aag tcg acg gag act ggc cag tac ctt 361
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
55 65 70 75 80

60

65

ES 2 284 677 T3

<400> 3

```

atggctgaag gggaaatcac caccttcaca gccctgaccg agaagtttaa totgcctcca 60
gggaattaca agaagcccaa actcctctac tgtagcaacg ggggccactt cctgaggatc 120
5 cttccggatg gcacagtgga tgggacaagg gacaggagcg accagcacat tcagctgcag 180
ctcagtgcgg aaagcgtggg ggaggtgtat ataaagagta ccgagactgg ccagtacttg 240
gccatggaca ccgacgggct tttatacggc tcacagacac caaatgagga atgtttgttc 300
ctggaaaggc tggaggagaa ccattacaac acctatata ccaagaagca tgcagagaag 360

10 aattggtttg ttggcctcaa gaagaatggg agctgcaaac gcggtcctcg gactcactat 420
ggccagaaag caatcttggt tctccccctg ccagtctctt ctgattaa 468

```

<210> 4

<211> 630

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Esta secuencia es una secuencia sintetizada químicamente que codifica una forma de 134 aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos con alteraciones para el uso de codones preferidos en *E. coli*

<221> CDS

<222> (122)...(526)

25

<400> 4

```

gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga aattaatacg actcactata ggggaattgt 60
gagcggataa caattcccct ctagaataaa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca 120
30 t atg aat tac aaa aaa ccc aag ctt ctt tac tgc agt aac gga gga cac 169
Met Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His
1 5 10 15

ttc ctg cga att ctg cca gat ggc aca gta gat ggg act cgc gat cgc 217
35 Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg
20 25 30

tcc gac cag cac att cag ctg caa ctc tcg gcc gaa agc gtt gga gag 265
40 Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu
35 40 45

gtc tat atc aag tcg acg gag act ggc cag tac ctt gcc atg gac acc 313
45 Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr
50 55 60

gat ggg ctt ctg tat ggc tca cag acg cct aac gaa gaa tgc ttg ttt 361
50 Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe
65 70 75 80

cta gaa aga cta gaa gaa aac cat tac aac acg tac ata tcg aaa aaa 409
55 Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys
85 90 95

cat gca gag aag aac tgg ttt gta ggc ctt aaa aaa aat ggt tcc tgt 457
60 His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys
100 105 110

aag cgt gga cca cgg act cac tat ggc caa aag gct atc ttg ttc ctg 505
65 Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu
115 120 125

cca cta cca gtg agc tcc gac taaggatccg aattcgagct ccgtcgacaa 556
70 Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
130 135

gcttgcggcc gcaactcgagc accaccacca ccaccactga gatccggctg ctaacaaagc 616
75 ccgaaaggaa gctg 630

```

<210> 5

ES 2 284 677 T3

<211> 135

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<223> Secuencia de proteína traducida para la forma de 134 aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos ácido sintetizada químicamente

10 <400> 5

```

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

```

<210> 6

35 <211> 630

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Esta secuencia es una secuencia sintetizada químicamente que codifica una forma de 140 aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos con alteraciones para uso de codones preferidos en *E. coli*

<221> CDS

45 <222> (122)...(544)

<400> 6

```

gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcca aattaatcag actcactata ggggaattgt 60
gagcggataa caattcccct ctagaataaa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca 120
t atg ttt aac ctt ccg ccc ggg aat tac aaa aaa ccc aag ctt ctt tac 169
Met Phe Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
 1          5          10          15
55 tgc agt aac gga gga cac ttc ctg cga att ctg cca gat ggc aca gta 217
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
    20          25          30
60 gat ggg act cgc gat cgc tcc gac cag cac att cag ctg caa ctc tcg 265
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
 35          40          45

```

65

ES 2 284 677 T3

<211> 1822
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<221> señal TATA
<222> (102)...(107)
10 <221> CDS
<222> (193)...(202)
<221> intrón
<222> (203)...(458)
15 <221> CDS
<222> (459)...(619)
<221> intrón
20 <222> (620)...(828)
<221> CDS
<222> (829)...(948)
<221> intrón
25 <222> (949)...(1041)
<221> CDS
<222> (1042)...(1206)
<221> intrón
30 <222> (1207)...(1459)
<221> CDS
<222> (1460)...(1654)
35 <223> Secuencia sintetizada químicamente para la hormona de crecimiento humana utilizando los codones preferidos
de expresión en *E. coli*

40

45

50

55

60

65

ES 2 284 677 T3

<400> 8

```

5      ggagcttcta aattatccat tagcacaagc ccgtcagtgg ccccatgcat aaatgtacac 60
      agaaacaggt gggggcaaca gtgggagaga aggggccagg gtataaaaag ggcccacaag 120
      agaccggctc aaggatccca aggcccaact ccccgaaaca ctcagggtcc tgtggacgct 180
      cacctagctg ca atg gct aca g gtaagcgccc ctaaaatccc tttgggcaca      232
              Met Ala Thr
              1

10     atgtgtcctg aggggagagg cagcgacctg tagatgggac gggggcacta accctcaggt 292
      ttggggcttc tgaatgagta tcgccatgta agcccagtat ggccaatctc agaaagctcc 352
      tggtccttgg agggatggag agagaaaaac aaacagctcc tggagcaggg agagtgctgg 412
      cctcttgctc tccggctccc tctgttgccc tctggtttct ccccag gc tcc cgg acg 469
              Gly Ser Arg Thr
              5

20     tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg ctc tgc ctg ccc tgg ctt caa gag      517
      Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu
              10              15              20

25     ggc agt gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg ctt ttt gac aac gct      565
      Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala
              25              30              35

30     atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag      613
      Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln
              40              45              50              55

35     gag ttt gtaagctctt ggggaatggg tgcgcatcag ggggtggcagg aaggggtgac      669
      Glu Phe

40     tttccccgc tgggaaataa gaggaggaga ctaaggagct cagggttttt cccgaagcga 729
      aaatgcaggc agatgagcac acgctgagtg aggttcccag aaaagtaaca atgggagctg 789
      gtctccagcg tagaccttgg tgggcgggtcc ttctcctag gaa gaa gcc tat atc      843
              Glu Glu Ala Tyr Ile
              60

45     cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag acc tcc ctc      891
      Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu
              65              70              75

50     tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa      939
      Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln
              80              85              90

```

55

60

65

ES 2 284 677 T3

cag aaa tcc gtgagtggat gccttgaccc caggcgggga tgggggagac 988
 Gln Lys Ser
 95
 5 ctgtagtcag agccccggg cagcacagge caatgcccg t ccttcccctg cag aac 1044
 Asn
 10 cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag 1092
 Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu
 100 105 110
 15 ccc gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc 1140
 Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly
 115 120 125 130
 20 gcc tct gac agc aac gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc 1188
 Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly
 135 140 145
 25 atc caa acg ctg atg ggg gtgggggtgg cgctaggggt ccccaatctt 1236
 Ile Gln Thr Leu Met Gly
 150
 30 ggagccccac tgactttgag agctgtgtta gagaaacact gctgccctct ttttagcagt 1296
 ccaggccctg acccaagaga actcacotta ttcttcattt cccctegtga atcctctagc 1356
 ctttctctac accctgaagg ggagggagga aatgaatga atgagaaagg gaggagcag 1416
 tacccaagcg cttggcctct ccttctcttc cttcactttg cag agg ctg gaa gat 1471
 Arg Leu Glu Asp
 155
 35 ggc agc ccc cgg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc 1519
 Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe
 40 160 165 170
 45 gac aca aac tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg 1567
 Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu
 175 180 185
 50 ctc tac tgc ttc agg aag gac atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc 1615
 Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg
 190 195 200
 55 atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt ggc ttc tagctgcccg 1664
 Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 205 210 215
 60 ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctctgccc cttggaagtt gccactccag 1724
 tgcccaccag ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 1784
 ctataatatt atgggggtgga ggggggtggt ttggagca 1822

<210> 9

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 284 677 T3

<400> 9

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

35 <210> 10
 <211> 990
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada químicamente para el interferón alpha-2b humano
 <221> promotor
 45 <222> (231)...(249)
 <221> CDS
 <222> (320)...(784)

50

55

60

65

ES 2 284 677 T3

<400> 10

```

    gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt 60
    tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg 120
5   tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag 180
    gagcacgatac atgcgcaccc gtggggccgc cagatctcga tcccgcgaaa ttaatacgac 240
    tcaactatagg ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaantaatt ttgtttaact 300
    ttaagaagga gatatacat atg gct gaa ggg gaa atc acc acc ttt aca gcg 352
10                                Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala
                                1           5           10

    tta acg gag aaa ttt aac ctt ccg ccc ggg aat tac aaa aaa ccc aag 400
    Leu Thr Glu Lys Phe Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys
15                                15           20           25

    ctt ctt tac tgc agt aac gga gga cac ttc ctg cga att ctg cca gat 448
    Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp
20                                30           35           40

    ggc aca gta gat ggg act cgc gat cgc tcc gac cag cac att cag ctg 496
    Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu
25                                45           50           55

    caa ctc tcg gcc gaa agc gtt gga gag gtc tat atc aag tcg acg gag 544
    Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu
30                                60           65           70           75

    act ggc cag tac ctt gcc atg gac acc gat ggg ctt ctg tat ggc tca 592
    Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser
35                                80           85           90

    cag acg cct aac gaa gaa tgc ttg ttt cta gaa aga cta gaa gaa aac 640
    Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn
40                                95           100          105

    cat tac aac acg tac ata tcg aaa aaa cat gca gag aag aac tgg ttt 688
    His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe
45                                110          115          120

    gta ggc ctt aaa aaa aat ggt tcc tgt aag cgt gga cca cgg act cac 736
    Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His
50                                125          130          135

    tat ggc caa aag gct atc ttg ttc ctg cca cta cca gtg agc tcc gac 784
    Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
55                                140          145          150          155

    taaggatccg aattcgagct ccgtcgacaa gcttgccggcc gcactcgagc accaccacca 844
    ccaccactga gatccggctg ctaacaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac 904
    cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggctctctaaa cgggtcttga ggggtttttt 964

    gctgaaagga ggaactatat ccggat 990

```

<210> 11

<211> 155

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65 <220>

<223> Secuencia de proteína traducida para el interferón alpha-2b humano sintetizada químicamente

ES 2 284 677 T3

<400> 11

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

25

30

35

40

45

50

55

60

65