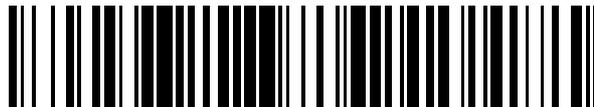


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 383**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007 E 07741485 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2011880**

54 Título: **Gen transportador de taurina**

30 Prioridad:

13.04.2006 JP 2006110467

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU
TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**TABUCHI, HISAHIRO;
SUGIYAMA, TOMOYA;
TANAKA, SAEKO y
TAINAKA, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 397 383 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

Gen transportador de taurina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un polipéptido usando una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina.

Técnica anterior

10 Cuando se producen proteínas útiles como productos farmacéuticos con la técnica de ADN recombinante, el uso de células animales permite una modificación postraduccional complicada y un plegamiento que las células procariotas no pueden realizar. Por lo tanto, las células animales se usan frecuentemente como células huésped para producir proteínas recombinantes.

Recientemente, se han desarrollado un gran número de productos biofarmacéuticos, tales como anticuerpos y proteínas fisiológicamente activas. Las técnicas que permiten la producción eficaz de proteínas recombinantes por células animales conducen a la reducción de costes de los productos biofarmacéuticos y aseguran un suministro estable a los pacientes.

Bajo estas circunstancias, se desea un procedimiento de producción de proteínas con una mayor eficacia de producción.

15 La taurina es un tipo de aminoácido presente en altas concentraciones en peces, crustáceos y moluscos y es un nutriente importante para el crecimiento de mamíferos. Aunque la taurina no se usa en síntesis de proteínas, tiene muchas funciones tales como normalización de la hipercolesterolemia, reducción de la presión sanguínea, efecto desintoxicante, mantenimiento de la función inmunitaria, estabilización de membranas biológicas, regulación de la excitabilidad neuronal, antioxidación, etc. Se sabe que la taurina contribuye a la osmorregulación y la estabilización de la membrana celular en
20 células cultivadas (en el documento distinto de patente 1). Sin embargo, la adición de taurina al medio de cultivo primario de astrocitos donde estaba funcionando el transportador de taurina no hizo aumentar la incorporación en las células (en el documento distinto de patente 2). Por tanto, la adición de taurina al medio sola fue insuficiente.

25 Por otro lado, se desconoce totalmente si la incorporación de taurina y otros aminoácidos en células cultivadas por medio del transportador de taurina contribuye o no a la mejora de la producción de una proteína recombinante deseada en las células cultivadas.

Se conocen varios transportadores de taurina (humano: documento distinto de patente 3; de ratón: documento distinto de patente 4; y de rata: documento distinto de patente 5) y su implicación en la incorporación de taurina y otros aminoácidos (p. ej., β -alanina) en células (en el documento distinto de patente 6). Sin embargo, con respecto al transportador de taurina de hámster, se desconocía incluso su existencia todavía.

30 Documento no patente 1

Ian Henry Lambert, *Neurochemical Research* (2004) 29(1), 27-63

Documento no patente 2

Journal of Neurochemistry (2000), 75(3), 919-924

Documento no patente 3

35 Uchida, S. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* (1992) 89 (17), 8230-8234

Documento no patente 4

Liu, Q.R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89 (24), 12145-12149

Documento no patente 5

Smith, K.E. *et al.*, *Mol. Pharmacol.* (1992) 42 (4), 563-569

40 Documento no patente 6

Ryo Shioda *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2002) 43 (9), 2916

Divulgación de la invención

Problema que ha de resolver la invención

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento capaz de producir una proteína natural o recombinante a coste bajo.

Medios para resolver el problema

Como consecuencia de una investigación extensiva e intensiva dirigidas a la resolución del problema anterior, los presentes inventores han descubierto que se puede aumentar el rendimiento de un polipéptido deseado usando una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina. Por tanto, se ha logrado la presente invención.

- 5 La presente invención se puede resumir como sigue.
- (1) Un procedimiento de producción de un polipéptido, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina y tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado y, de este modo, permite que la célula produzca dicho polipéptido, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de taurina es una célula en la que se ha transferido un ADN que codifica el transportador de taurina y en el que la célula es una célula de mamífero.
- 10 (2) El procedimiento de (1) anterior, en el que la célula es una célula de ovario de hámster chino.
- (3) El procedimiento de uno cualquiera de (1) a (2) anteriores, en el que el polipéptido deseado es un anticuerpo.
- (4) El procedimiento de uno cualquiera de (2) a (3) anteriores, en el que el ADN que codifica el transportador de taurina es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e):
- 15 (a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8;
- (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- 20 (c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene un 70 % o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- (d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7;
- (e) un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.
- 25 (5) El procedimiento de uno cualquiera de (1) a (4) anteriores, que comprende cultivar las células en un medio con una concentración de taurina de 0 a 100 g/l.
- (6) Un procedimiento de preparación de un producto farmacéutico que contiene un polipéptido deseado, que comprende las etapas de:
- 30 preparar un polipéptido mediante el procedimiento de uno cualquiera de (1) a (5) y mezclar dicho polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (7) Una célula de mamífero en la que se ha transferido un ADN que codifica un transportador de taurina y aun así tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado.
- También se divulga un ADN que codifica un transportador de taurina, que es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e), con la condición de que se excluyan el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7:
- 35 (a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- 40 (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina,
- (c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene un 97% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- 45 (d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- (e) un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad

transportadora de taurina.

También se divulga un polipéptido que es uno cualquiera de los siguientes (A) a (E), con la condición de que se excluyan un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8.

(A) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(B) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;

(C) un polipéptido que tiene un 97% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;

(D) un polipéptido codificado por un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1;

(E) un polipéptido codificado por un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.

También se divulga un vector recombinante que comprende el ADN divulgado anteriormente.

También se divulga una célula en la cual se ha transferido el ADN divulgado anteriormente.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, se ha hecho posible producir un polipéptido deseado a coste bajo.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen transportador de taurina de hámster derivado de células CHO recién clonado y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del mismo.

La fig. 2 es una topología de membrana de un transportador de taurina que se creó basándose en las regiones transmembranarias y orientaciones predichas por el programa TMpred a partir de la secuencia de aminoácidos de un TauT de hámster derivado de células CHO recién clonado con referencia a la FIG. 5 de Shinichi Uchida *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pág. 8230-8234, septiembre de 1992. La marca © indica residuos de aminoácido específicos de TauT de hámster. En el 2º bucle (EX: región de membrana extracelular), la 12ª región transmembranaria (TM) y la C-terminal (IC: región intracelular) están presentes un gran número de residuos de aminoácido diferentes de los de TauT humano.

La fig. 3 muestra un plásmido que se usó para expresar TauT de hámster (622 aminoácidos).

La fig. 4 muestra representaciones gráficas de densidad de células viables en el día 7 de cultivo discontinuo en matraz de agitación de 50 ml (n=7). La densidad de células viables en la célula transferida con pHyg/TauT fue superior a la de la célula transferida con pHyg (P<0,05).

La fig. 5 muestra representaciones gráficas de rendimiento de lactato en el día 7 de cultivo discontinuo en matraz de agitación de 50 ml (n=7). La célula transferida con pHyg/TauT produjo menos lactato y fue superior a la célula transferida con pHyg (P<0,05).

La fig. 6 muestra representaciones gráficas de rendimiento de anticuerpo anti-glipicano-3 en el día 7 de cultivo discontinuo en matraz de agitación de 50 ml (n=7). Cuatro de las 7 cepas de la célula transferida con pHyg/TauT mostraron rendimientos de anticuerpo mayores que el rendimiento más alto de la célula transferida con pHyg.

La fig. 7 muestra representaciones gráficas de rendimiento de anticuerpo anti-glipicano-3 en el día 7 de cultivo semicontinuo en matraz de agitación de 50 ml (n=7). El rendimiento de anticuerpo en la célula transferida con pHyg/TauT fue superior al de la célula transferida con pHyg (P<0,01).

La fig. 8 es una gráfica que muestra la tasa de supervivencia de una célula T10 transferida con pHyg/TauT (que mostró una gran capacidad de crecimiento durante el proceso de expansión en cultivo estático) en cultivo semicontinuo en frasco de 1 l. La tasa de supervivencia de T10 fue del 80 % o más incluso en el día 32 del cultivo. Por otro lado, la tasa de supervivencia de la cepa original se convirtió en menos del 80 % en el día 19.

La fig. 9 es una gráfica que muestra el rendimiento de anticuerpo de una célula T10 transferida con pHyg/TauT (que mostró una gran capacidad de crecimiento durante el proceso de expansión en cultivo estático) en cultivo semicontinuo en

frasco de 1 l. El rendimiento de anticuerpo anti-glipicano-3 de T10 fue de 2,9 g/l en el día 35 del cultivo.

La fig 10 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo que indican que la célula T10 transferida con TauT expresa moléculas TauT sobre su membrana celular. Como anticuerpo primario se usó anticuerpo de conejo anti-transportador de taurina de rata (Alpha Diagnostics, EE. UU.) (\pm anticuerpo). Como anticuerpo secundario se usó como marcaje anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con ficoeritrina (Abcam, Reino Unido).

La fig. 11 es una gráfica que muestra los contenidos intracelulares de amoníaco (proporciones de concentración) en cultivo semicontinuo en frasco de 1 l. La inhibición de amoníaco en cepas transferidas con pHyg/TauT fue notable en comparación con la cepa original.

La fig. 12 es una gráfica que muestra que la taurina se incorpora en las células en función de la concentración de taurina en el medio. No se observaron diferencias en la incorporación de taurina entre cepas transferidas con pHyg/TauT y la cepa original.

La fig. 13 es una gráfica que muestra el consumo de glutamina en el medio. En comparación con la cepa original, las cepas transferidas con pHyg/TauT mostraron un consumo de glutamina notablemente alto por célula con independencia de la concentración de taurina en el medio.

La fig. 14 es una gráfica que muestra que los rendimientos de anticuerpo anti-glipicano-3 de cepas transferidas con pHyg/TauT son casi iguales con independencia de la concentración inicial de taurina en el medio.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento se describirán con más detalle realizaciones de la presente invención.

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina y tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado y, de este modo, permite que la célula produzca el polipéptido.

En el procedimiento de la presente invención, la célula puede ser una célula natural capaz de producir el polipéptido deseado o una célula transformada en la que se ha transferido un ADN que codifica el polipéptido deseado. Preferentemente, se usa una célula transformada en la que se ha transferido un ADN que codifica el polipéptido deseado.

En el procedimiento de la presente invención, el polipéptido deseado no está particularmente limitado. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido tal como un anticuerpo (p. ej., anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-glipicano-3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-VSR, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-VLA4 y similares) o una proteína fisiológicamente activa (p. ej., factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleucinas tales como IL-1 o IL-6, t-PA, urocinasa, seroalbúmina, factor de coagulación sanguínea, PTH y similares). En particular, se prefiere un anticuerpo, y puede ser un anticuerpo tal como un anticuerpo natural, un anticuerpo de dimensiones de bajo peso molecular (p. ej., Fab, scFv, sc(Fv)₂), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, etc.

Los presentes inventores han descubierto que, usando una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina, se promueve específicamente la incorporación intracelular, no sólo de taurina y β -alanina, sino también de glutamina, por medio del transportador de taurina fuertemente expresado.

Se sabe que el transportador de taurina es una proteína de membrana que tiene la función de incorporar aminoácidos (tales como taurina y β -alanina) en células. Sin embargo, no se sabe si las células comienzan a incorporar glutamina específicamente cuando se deja que expresen fuertemente un transportador de taurina. Dado que se sabe que la glutamina participa en la producción de anticuerpos en hibridomas (Yeon-Ho Jeong *et al.*, Enzyme and Microbial Technology (1995) 17, 47-55), el efecto de la potenciación de la producción de proteína (p. ej., anticuerpo) por una célula que se ha dejado que exprese fuertemente un transportador de taurina puede estar provocado por la incorporación específica mediada por el transportador de taurina de glutamina en células.

Una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina no está particularmente limitada siempre que la célula tenga un nivel de expresión de transportador de taurina aumentado en comparación con la célula natural correspondiente. La célula natural no está particularmente limitada. Se puede usar una célula que se usa como huésped en la producción de una proteína recombinante (p. ej., células CHO).

Como una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina, se puede dar una célula en la cual se ha transferido artificialmente un gen transportador de taurina. Se puede preparar una célula en la cual se ha transferido artificialmente un gen transportador de taurina mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar una célula de este tipo incorporando un gen transportador de taurina en un vector y transformando el vector en una célula.

Como transportador de taurina que se va a expresar fuertemente en una célula, se puede usar un transportador de taurina

derivado de cualquier organismo. Específicamente, se puede usar un transportador de taurina derivado de ser humano o un roedor (tal como ratón, rata o hámster). Preferentemente, se puede usar un transportador de taurina derivado de ser humano, un roedor o de la misma especie que la célula huésped. Por ejemplo, cuando la célula que se deja que exprese fuertemente un transportador de taurina es una célula de ovario de hámster chino (células CHO), el transportador de taurina deriva preferentemente de ser humano o hámster.

Además, como gen transportador de taurina que se va a expresar fuertemente en una célula, se puede usar cualquiera de los siguientes ADN (a) a (e) que codifican un transportador de taurina.

- (a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8;
- (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- (c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene un 70% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- (d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7.
- (e) un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.
- La célula que expresa fuertemente un transportador de taurina puede ser cualquier célula. Preferentemente, se usan células CHO; se prefieren particularmente células CHO-dhfr-.

La producción de un polipéptido deseado se puede realizar transfiriendo un gen que codifique el polipéptido deseado a una célula que exprese fuertemente un transportador de taurina y cultivando la célula resultante.

Cuando se produce un polipéptido deseado usando una célula en la cual se ha transferido artificialmente un gen transportador de taurina, el orden de la transferencia de un gen transportador de taurina y la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado no está particularmente limitado. Se puede transferir un gen que codifica un polipéptido deseado después de la transferencia de un gen transportador de taurina. De forma alternativa, se puede transferir un gen transportador de taurina después de la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado. También se pueden transferir un gen transportador de taurina y un gen que codifica un polipéptido deseado simultáneamente.

Se pueden transferir un gen transportador de taurina y un gen que codifica un polipéptido deseado simultáneamente en un solo vector. De forma alternativa, se pueden transferir por separado usando una pluralidad de vectores.

Para cultivar la célula que expresa fuertemente un transportador de taurina, se pueden usar medios usados en cultivo celular convencional (preferentemente, cultivo de células animales). Habitualmente, estos medios contienen aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía, reguladores osmóticos, fuentes de hierro y reguladores del pH. Habitualmente, los contenidos en estos componentes son los siguientes: 0,05-1500 mg/l de aminoácidos, 0,001-10 mg/l de vitaminas, 0-200 mg/l de factores lipídicos, 1-20 g/l de fuentes de energía, 0,1-10000 mg/l de reguladores osmóticos, 0,1-500 mg/l de fuentes de hierro, 1-10000 mg/l de reguladores del pH, 0,00001-200 mg/l de oligoelementos metálicos, 0-5000 mg/l de tensioactivos, 0,05-10000 µg/l de cofactores de crecimiento y 0,001-50 mg/l de nucleósidos. Sin embargo, los contenidos no están limitados a estos intervalos y se pueden seleccionar de forma apropiada en función del tipo de célula que se va a cultivar, el tipo de polipéptido deseado, etc.

Además de estos componentes, se pueden añadir oligoelementos metálicos, tensioactivos, cofactores de crecimiento, nucleósidos y similares.

Los ejemplos específicos de componentes de este tipo incluyen aminoácidos, tales como L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, preferentemente, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cistina, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; vitaminas, tales como i-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B₁₂ y ácido ascórbico, preferentemente, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B₁₂ y ácido ascórbico; factores lipídicos, tales como cloruro de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico y colesterol, preferentemente, cloruro de colina; fuentes de energía, tales como glucosa, galactosa, manosa y fructosa, preferentemente, glucosa; reguladores osmóticos, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y nitrato de potasio, preferentemente, cloruro de sodio; fuentes de hierro, tales como hierro EDTA, citrato férrico, cloruro ferroso, cloruro férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico y nitrato férrico,

preferentemente, cloruro férrico, hierro EDTA y citrato férrico; y reguladores del pH, tales como hidrogenocarbonato de sodio, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio, HEPES y MOPS, preferentemente, hidrogenocarbonato de sodio. Pueden darse como ejemplos medios de cultivo que contengan cualquiera de estos componentes.

5 Además de los componentes anteriores, se pueden añadir oligoelementos metálicos, tales como sulfato de cobre, sulfato de manganeso, sulfato de cinc, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, cloruro de estaño, cloruro de magnesio y subsulfato de sodio, preferentemente, sulfato de cobre, sulfato de cinc y sulfato de magnesio; tensioactivos, tales como Tween 80 y Pluronic F68; cofactores de crecimiento, tales como insulina recombinante, IGF-1 recombinante, EGF recombinante, FGF recombinante, PDGF recombinante, TGF- α recombinante, clorhidrato de etanolamina, selenita de sodio, ácido retinoico y diclorhidrato de putrescina, preferentemente, selenita de sodio, clorhidrato de etanolamina, IGF-1 recombinante y diclorhidrato de putrescina; y nucleósidos, tales como desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, adenosina, citidina, guanosina y uridina. En ejemplos preferibles de los medios anteriores, pueden estar contenidos antibióticos, tales como estreptomina, penicilina-G potasio y gentamicina, e indicadores de pH, tales como rojo de fenol.

El pH del medio varía en función de la célula que se va a cultivar. En general, es apropiado un pH de 6,8-7,6. En muchos casos, es apropiado un pH de 7,0-7,4.

15 También se puede usar un medio comercial para cultivo de células animales, p. ej., D-MEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), mezcla 1:1 de D-MEM/F-12 (medio Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12), RPMI1640, CHO-S-SFMII (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH Biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific), PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich) o similares.

De forma alternativa, el medio puede ser un medio sin suero.

20 Cuando la célula que expresa fuertemente un transportador de taurina es una célula CHO, se pueden cultivar las células CHO mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, habitualmente se pueden cultivar las células CHO en una atmósfera con una concentración de CO₂ en la fase gaseosas del 0 al 40 %, preferentemente del 2 al 10 %, a de 30 a 39 °C, preferentemente aproximadamente a 37 °C.

25 Como resulta evidente a partir de los ejemplos descritos más adelante, se puede evitar la producción de productos de desecho (tales como lactato) que resultan ser sustancias inhibitoras del crecimiento celular en una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina. Como consecuencia, la célula muestra el efecto de mantener una tasa de supervivencia alta. La célula de la presente invención es capaz de permanecer en cultivo durante tres meses o un periodo incluso mayor.

30 Además, cuando se produce un polipéptido deseado, tal como un anticuerpo, en células cultivadas, las células alcanzan un estado de alta concentración (aproximadamente 1×10^7 células/ml) en la etapa tardía de cultivo, y la influencia de los productos de desecho tales como el lactato, se hace extremadamente alta. Cuando se produce un polipéptido deseado usando la célula de la presente invención, se mantiene una tasa de supervivencia alta incluso en la etapa tardía de cultivo, y se puede esperar una mejora en el rendimiento del polipéptido deseado.

35 Habitualmente, un periodo de cultivo apropiado para producir un polipéptido deseado usando la célula de la presente invención es de 1 día a 3 meses, preferentemente de 1 día a 2 meses, más preferentemente de 1 día a 1 mes.

40 Con respecto a los diversos dispositivos de cultivo para cultivo de células animales, se puede usar un dispositivo de cultivo de depósito de tipo fermentador, un dispositivo de cultivo de tipo de agitación por aire, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de cultivo, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de agitación, un dispositivo de cultivo de tipo microtransportador, un dispositivo de cultivo de tipo lecho fluidizado, un dispositivo de cultivo de tipo fibra hueca, un dispositivo de cultivo de tipo frasco rotatorio, un dispositivo de cultivo de tipo lecho empaquetado o similar.

El cultivo se puede realizar mediante cualquier procedimiento de cultivo tal como cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo o cultivo continuo. Preferentemente, se usa el cultivo semicontinuo o el cultivo continuo. Se prefiere más el cultivo semicontinuo.

45 Cuando se cultiva la célula de la presente invención, se puede añadir taurina al medio para promover la incorporación de taurina en las células. La concentración de taurina añadida al medio no está particularmente limitada. Habitualmente, la concentración es de 0-100 g/l, preferentemente de 0-20 g/l, más preferentemente de 0-10 g/l.

Cuando el polipéptido producido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención tiene una actividad biológica útil como producto farmacéutico, se puede producir un producto farmacéutico mezclando este polipéptido con vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables y formulando con él una preparación.

50 Los ejemplos específicos de vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, disolventes orgánicos que son farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, poliácido de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetil almidón de sodio, pectina, metilcelulosa, etil celulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, agaragar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, seroalbúmina humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos que son aceptables como aditivos farmacéuticos.

Los aditivos reales se puede seleccionar de los aditivos mencionados anteriormente individualmente o en combinación de acuerdo con la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención, pero no se limitan a los enumerados anteriormente. Por ejemplo, cuando se usa un polipéptido en una formulación inyectable, se puede disolver el polipéptido purificado en un disolvente tal como solución salina fisiológica, tampón o una solución de glucosa, y después se puede añadir a la solución un inhibidor de la adsorción tal como Tween 80, Tween 20, gelatina o seroalbúmina humana. De forma alternativa, se puede usar un agente liofilizante para preparar una forma de dosificación que se disuelve y reconstituye antes de su uso. Los ejemplos del excipiente útil para la liofilización incluyen alcoholes de azúcar y sacáridos tales como manitol y glucosa.

Se pueden seleccionar de forma apropiada dosis eficaces del polipéptido en función del tipo de polipéptido, el tipo de enfermedad que se va a tratar o evitar, la edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo anti-glipicano, la dosis eficaz de anticuerpo anti-glipicano se selecciona en un intervalo de 0,001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración. De forma alternativa, se puede seleccionar una dosis de 0,01-100000 mg/cuerpo por paciente. No obstante, la dosis eficaz no se limita a estos intervalos.

El polipéptido se puede administrar por vía oral o parenteral, pero se prefiere la administración parenteral. Específicamente, se pueden enumerar inyección (p. ej., administración sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, etc.), administración transnasal, administración transpulmonar, administración transdérmica y similares.

También se divulga un polipéptido que es uno cualquiera de los siguientes (A) a (E), con la condición de que se excluyan un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8:

- (A) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- (B) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- (C) un polipéptido que tiene un 97% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
- (D) un polipéptido codificado por un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1; o
- (E) un polipéptido codificado por un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.

Los polipéptidos novedosos divulgados son de transportador de taurina de hámster y los polipéptidos que son funcionalmente equivalentes al mismo.

En la presente invención, la expresión "funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster" significa que tiene actividades similares a las actividades del transportador de taurina de hámster, tales como la actividad de unión a taurina, la actividad de transportar la taurina al interior de la célula, etc. Un polipéptido de este tipo engloba, por ejemplo, mutantes de transportador de taurina de hámster.

Como procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico, se pueden dar procedimientos para introducir mutaciones en polipéptidos. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrían preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes al transportador de taurina de hámster introduciendo de forma apropiada mutaciones en aminoácidos del transportador de taurina de hámster mediante mutagénesis dirigida a sitio (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ. y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100,468-500; Kramer, W. *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W. y Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766). Las mutaciones en aminoácidos también se pueden producir en la naturaleza. Así, un polipéptido que tiene un aminoácido derivado de la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención por mutación de uno o más aminoácidos y que es funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster también se incluye en el polipéptido de la presente invención.

Los ejemplos específicos de polipéptidos funcionalmente equivalentes al transportador de taurina de hámster usados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención incluyen, entre otros, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácido del transportador de taurina de hámster por delección de uno o más aminoácidos, preferentemente 1-30 aminoácidos, más preferentemente 1-20 aminoácidos, incluso más preferentemente 1-10 aminoácidos, lo más preferentemente 1-5 aminoácidos; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada del transportador de taurina de hámster por adición de uno o más aminoácidos, preferentemente 1-30 aminoácidos, más preferentemente 1-20 aminoácidos, incluso más preferentemente 1-10 aminoácidos, lo más

preferentemente 1-5 aminoácidos; y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster por sustitución de uno o más aminoácidos, preferentemente 1-30, más preferentemente 1-20 aminoácidos, incluso más preferentemente 1-10 aminoácidos, lo más preferentemente 1-5 aminoácidos, con otros aminoácidos.

- 5 Los residuos de aminoácido que se van a mutar no están particularmente limitados. Preferentemente, los residuos de aminoácido se mutan a otros aminoácidos en los que se conserva la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido inicial. Los ejemplos específicos de la naturaleza de la cadena lateral de los aminoácidos incluyen aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, Q H, K, S y T), aminoácidos con una cadena lateral alifática (Q A, V, L, I y P), aminoácidos con una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T e Y), aminoácidos con una
10 cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C y M), aminoácidos con una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y un grupo amida (D, N, E y Q), aminoácidos con una cadena lateral que contiene una base (R, K y H) y aminoácidos con una cadena lateral que contiene un grupo aromático (H, F, Y y W) (entre paréntesis se encuentran los códigos de una letra para los aminoácidos).

- 15 Se ha informado de que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original por modificación (tal como delección, adición y/o sustitución de uno o más aminoácidos) mantiene la actividad biológica del polipéptido original (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M. J. y Smith, M Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500; Wang, A *et al.*, Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).

- 20 Como ejemplo del polipéptido en el que se añaden uno o más residuos de aminoácido al transportador de taurina de hámster de la presente descripción, se puede dar un polipéptido de fusión que comprende el transportador de taurina de hámster. Un polipéptido de fusión de este tipo está formado por la proteína de la descripción (transportador de taurina de hámster) y otro polipéptido fusionado al mismo. Un polipéptido de fusión de este tipo se incluye en la presente descripción. Un polipéptido de este tipo se puede preparar enlazando un gen que codifica el transportador de taurina de hámster de la presente descripción en marco con un gen que codifica el otro polipéptido, transfiriendo el ADN resultante en un vector de
25 expresión y expresando el ADN en una célula huésped. Se pueden usar las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. No existen limitaciones acerca del polipéptido que se va a fusionar al polipéptido de la presente descripción.

- Los ejemplos de polipéptidos que se van a fusionar con el polipéptido de la presente descripción incluyen, entre otros, FLAG (Hopp, T. P. *et al.*, BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6xHis que comprende seis residuos de histidina (His), 10xHis, hemaglutinina del virus de la gripe (HA), fragmento de c-myc humano, fragmento de VSV-GP, fragmento de p18HIV, marca T7, marca VHS, marca E, fragmento antigénico de SV40T, marca Ick, fragmento de α -tubulina, marca B, fragmento de proteína C, glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina del virus de la gripe (HA), región constante de
30 inmunoglobulina, β -galactosidasa y proteína de unión a maltosa (MBP).

Se fusiona un gen disponible comercialmente que codifica dicho polipéptido al gen que codifica el polipéptido de la presente descripción. El gen fusionado preparado de este modo se expresa para preparar un polipéptido fusionado.

- 35 Un procedimiento alternativo conocido por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico es un procedimiento que usa la técnica de hibridación (Sambrook, J *et al.*, Molecular Cloning 2^a ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Los expertos en la técnica podrían aislar de forma rutinaria un ADN altamente homólogo a la secuencia del ADN del transportador de taurina de hámster usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención basado en la secuencia de ese ADN o una parte de la misma, y
40 aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes al transportador de taurina de hámster a partir de ese ADN. Así, un polipéptido que está codificado por un ADN que hibrida con el ADN o una parte del mismo, que codifica el transportador de taurina de hámster usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención y que es funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster de la presente descripción también se incluye en el polipéptido de la presente descripción.

- 45 Las condiciones de hibridación para aislar un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se pueden seleccionar de forma apropiada por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden dar condiciones de hibridación poco rigurosas. Son condiciones poco rigurosas, por ejemplo, 42 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %, preferentemente 50 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %. Más preferentemente, se pueden dar condiciones muy rigurosas. Por ejemplo, son condiciones muy rigurosas 65 °C, 2 x
50 SSC y SDS al 0,1 %. Bajo estas condiciones, a medida que disminuye la temperatura de hibridación, no sólo se obtienen ADN con homología alta, sino también ADN con homología baja. Por el contrario, se espera que, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, se obtengan sólo los ADN con homología alta. Sin embargo, no sólo la temperatura afecta a la rigurosidad de la hibridación, sino también una pluralidad de factores (tales como las concentraciones de sales). Los expertos en la técnica podrían seleccionar estos factores de forma apropiada para llevar a cabo una rigurosidad similar.

- 55 Habitualmente, el polipéptido codificado por un ADN aislado mediante estas técnicas de hibridación tiene homología alta con el transportador de taurina de hámster de la presente descripción en la secuencia de aminoácidos. El polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención también incluye los polipéptidos que son funcionalmente equivalentes al transportador de taurina de hámster de la presente descripción y tienen homología alta con la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster de la presente descripción. El término "homología alta" se refiere

habitualmente al 97 % o más de homología, preferentemente el 98 % o más de homología, más preferentemente el 99 % o más de homología. Para determinar la homología de polipéptidos, se puede seguir el algoritmo descrito en Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730.

5 El polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede variar en su secuencia de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico, presencia y ausencia de cadenas de azúcar, morfología, etc. en función de la célula o huésped que produce el polipéptido o el procedimiento de purificación que se describirá más adelante. Sin embargo, siempre que el polipéptido resultante tenga funciones equivalentes a las funciones del transportador de taurina de hámster de la presente descripción, el polipéptido se incluye en la presente descripción. Por ejemplo, cuando el polipéptido de la presente descripción se expresa en un procarionta (p. ej., *Escherichia coli*), se añade un residuo de metionina en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos inicial del polipéptido. Cuando el polipéptido de la presente descripción se expresa en un eucariota (p. ej., una célula de mamífero), se elimina la señal de secuencia N-terminal. El polipéptido de la presente descripción incluye polipéptidos de este tipo.

15 El polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se puede preparar como un polipéptido recombinante o un polipéptido natural mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Se puede preparar un polipéptido recombinante incorporando un ADN que codifica el polipéptido de la presente descripción en un vector de expresión apropiado, introduciendo el vector en una célula huésped apropiada, recogiendo el transformante resultante, extrayendo un polipéptido en bruto y purificando después el polipéptido por cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico, de fase inversa o de filtración en gel o cromatografía de afinidad, en la que un anticuerpo frente al polipéptido de la presente descripción se fija en una columna) o una combinación de estas técnicas cromatográficas.

20 Cuando el polipéptido de la presente descripción se expresa en una célula huésped (p. ej., una célula animal o *E. coli*) como un polipéptido de fusión con el polipéptido de glutatión-S-transferasa o como un polipéptido recombinante con residuos de histidina añadidos, el polipéptido expresado se puede purificar con una columna de glutatión o una columna de níquel.

25 Tras la purificación de un polipéptido de fusión, se pueden cortar las regiones distintas del polipéptido de interés con trombina o factor Xa y eliminarse del polipéptido de fusión.

30 Cuando el polipéptido de la presente descripción es un polipéptido natural, el polipéptido se puede aislar mediante procedimientos de purificación conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede aplicar un extracto de tejido o células que expresan el polipéptido de la presente descripción a una columna de afinidad a la que está unido un anticuerpo frente al transportador de taurina de hámster descrito más adelante. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

35 Además, la presente descripción proporciona un ADN que se puede usar en el procedimiento de la presente invención que codifica un transportador de taurina, que es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e), con la condición de que se excluyan el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7:

(a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

40 (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más (varios) residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;

(c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene un 97% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;

(d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1; o

45 (e) un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.

50 El ADN se usa en la producción *in vivo* o *in vitro* del polipéptido en el procedimiento de la presente invención como se describe anteriormente. Además, el ADN se puede usar en la creación de una célula que expresa fuertemente el transportador de taurina de hámster. El ADN puede adoptar cualquier forma, siempre que sea capaz de codificar el polipéptido de la presente descripción. Es decir, el ADN puede ser, por ejemplo, un ADNc sintetizado a partir de ARNm, un ADN genómico o un ADN sintetizado químicamente. Cabe destacar que, siempre que el ADN sea capaz de codificar el polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el ADN puede tener cualquier secuencia de nucleótidos basada en la degeneración del código genético.

55 El ADN se puede preparar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar el ADN preparando una colección de ADNc a partir de una célula que expresa el polipéptido de la presente

- descripción y realizando la hibridación usando una parte de la secuencia de ADN (p. ej., la SEQ ID NO: 1) como sonda. La colección de ADNc se puede preparar, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). De forma alternativa, se puede usar una colección de ADNc comercial. También se puede preparar el ADN de la presente descripción preparando ARN a partir de una célula que expresa el polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, sintetizando moléculas de oligo ADN basadas en la secuencia del ADN de la presente descripción (p. ej., la SEQ ID NO: 1) y realizando una PCR usando las moléculas de oligo ADN como cebadores para, de este modo, amplificar un ADNc que codifica el transportador de taurina.
- Además, determinando la secuencia de nucleótidos del ADNc resultante, se puede determinar la región de traducción que codifica el polipéptido y obtener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente descripción. Además, rastreando una colección genómica usando el ADNc resultante como sonda, se puede aislar un ADN genómico.
- Específicamente, se pueden usar los procedimientos siguientes. En primer lugar, se aísla ARNm a partir de células, tejidos o similares que expresan el polipéptido de la presente descripción. Para aislar el ARNm, se prepara el ARN total mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.*, Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el procedimiento de AGPC (Chomczynski, P. y Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) o similares y después se purifica el ARNm a partir del ARN total usando el kit de purificación de ARNm (Pharmacia), etc. De forma alternativa, se puede preparar ARNm directamente usando el kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).
- A partir del ARNm resultante, se sintetiza ADNc usando una transcriptasa inversa. De forma alternativa, se puede sintetizar ADNc usando un kit tal como un kit de síntesis de ADNc de primera hebra con transcriptasa inversa AMV (SEIKAGAKU CORPORATION). También se puede sintetizar y amplificar ADNc de acuerdo con el procedimiento 5'-RACE (Frohman, M. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A *et al.*, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) usando el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores.
- Se prepara un fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR resultante y se liga a un ADN vector para, de este modo, preparar un vector recombinante. Se introduce el vector en un huésped (p. ej., E. coli), seguido de la selección de colonias resultantes para, de este modo, obtener un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés se puede confirmar mediante un procedimiento conocido tal como el procedimiento de terminación de la cadena de didesoxinucleótidos.
- Además, se puede diseñar una secuencia de nucleótidos con una mayor eficacia de expresión para el ADN de la presente descripción teniendo en cuenta la frecuencia de uso de los codones en el huésped que se va a usar para la expresión (Grantham, R. *et al.*, Nucleic Acids Research (1981) 9, pág. 43-74). Además, el ADN de la presente descripción se puede modificar usando kits disponibles comercialmente o procedimientos conocidos. Los ejemplos de estas modificaciones incluyen, entre otras, digestión con enzimas de restricción, inserción de oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de ADN apropiados, adición de enlazadores e inserción de un codón de iniciación (ATG) y/o un codón de terminación (TAA, TGA o TAG).
- El ADN que se puede usar de acuerdo con el procedimiento de la presente invención también incluye un ADN que hibrida con un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas y que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster.
- Los expertos en la técnica pueden seleccionar condiciones rigurosas de forma apropiada, incluidas, por ejemplo, condiciones poco rigurosas. Condiciones poco rigurosas se refiere, por ejemplo, a 42 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %, preferentemente 50 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %. Más preferentemente, se pueden seleccionar condiciones muy rigurosas. Condiciones muy rigurosas se refiere, por ejemplo, a 65 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %. Bajo estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, se pueden obtener ADN con una homología más alta. Preferentemente, el ADN que hibrida descrito anteriormente es un ADN derivado de la naturaleza, p. ej., ADNc o ADN cromosómico.
- Habitualmente, estos ADN aislados mediante técnicas de hibridación tiene una identidad de secuencia de nucleótidos alta con un ADN que codifica el transportador de taurina de hámster de la presente descripción. El ADN de la presente descripción también incluye un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al transportador de taurina de hámster de la presente descripción y tiene una identidad alta con un ADN que codifica el transportador de taurina de hámster de la presente descripción. El término "identidad alta" se refiere habitualmente al 96% o más de homología, preferentemente el 98 % o más de homología, más preferentemente el 99 % o más de homología. La identidad de secuencias de nucleótidos se pueden determinar mediante el algoritmo BLAST (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Basándose en este algoritmo, se han desarrollado programas tales como BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos con BLASTN basado en BLAST, se pueden fijar parámetros como puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, por ejemplo. Se conocen procedimientos específicos para estos procedimientos de análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Además, la presente descripción proporciona un vector en el cual se ha insertado el ADN de la presente descripción. El vector de la presente descripción es útil para mantener el ADN de la presente descripción en el interior de la célula

huésped y para permitir la expresión del polipéptido de la presente descripción (es decir, el transportador de taurina de hámster o un polipéptido funcionalmente equivalente al mismo). El vector de la presente descripción también es útil para permitir que la célula huésped exprese fuertemente el transportador de taurina. Permitiendo que la célula huésped exprese fuertemente el transportador de taurina, se promueve la incorporación de taurina en la célula huésped, lo que da lugar a un aumento de la producción de un polipéptido deseado en la célula huésped.

Cuando la célula huésped que se va a usar es *E. coli*, es preferible que el vector tenga un origen de replicación ("ori") de forma que el vector se amplifique en gran medida en *E. coli* (p. ej., JM109, DH5 α , HB101 y XL1-Blue) y se prepare en grandes cantidades, y también genes para seleccionar *E. coli* transformadas (p. ej., genes de resistencia a fármacos que permiten la discriminación de transformantes con algunos fármacos tales como ampicilina, tetraciclina, kanamicina o cloranfenicol). Los ejemplos de vectores preferibles incluyen, entre otros, vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Además de estos vectores, se pueden enumerar pGEM-T, pDIRECT, pT7, etc. cuando el vector se usa con el propósito de subclonar un ADNc y cortar el ADNc subclonado. Cuando el vector se usa con el propósito de producir el polipéptido de la presente descripción, es especialmente útil un vector de expresión. Cuando se pretende la expresión en *E. coli*, el vector de expresión tiene, preferentemente, las características descritas anteriormente, de forma que se amplifica el vector en *E. coli*, y también es preferible que tenga un promotor que permita la expresión eficaz en *E. coli* tal como JM109, DH5 α , HB101 o XL 1-Blue, p. ej., el promotor lacZ (Ward *et al.*, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), el promotor araB (Better *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043) o el promotor T7. Los ejemplos específicos de un vector de este tipo incluyen, además de los enumerados anteriormente, pGEX-5X-1 (Pharmacia), el sistema QIAexpress (Qiagen), pEGFP o pET (para su huésped, se prefiere el BL21 que expresa polimerasa de ARN de T7).

El vector puede comprender secuencias señal para la secreción de polipéptidos. Cuando el polipéptido se va a producir en el periplasma de *E. coli*, se puede usar la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.*, J. Bacterid. (1987) 169, 4379) como secuencia señal para la secreción del polipéptido. La introducción del vector en una célula huésped se puede realizar, por ejemplo, mediante el procedimiento de cloruro de calcio o por electroporación.

En casos donde se usa una célula huésped distinta de *E. coli*, los vectores útiles para producir el polipéptido de la presente descripción incluyen, entre otros, vectores de expresión derivados de mamíferos [p. ej., pcDNA3 de Invitrogen; pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p. 5322); pEF, pCDM8], vectores de expresión derivados de células de insectos (p. ej., el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC de GIBCO BRL; pBacPAK8), vectores de expresión derivados de vegetales (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (p. ej., pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZlpneo), vectores de expresión derivados de levaduras (p. ej., el kit de expresión en Pichia de Invitrogen; pNV11; SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50).

Cuando se pretende la expresión del polipéptido en células animales (tales como células CHO, células COS, células NIH3T3, etc.), el vector tiene, preferentemente, un promotor necesario para expresar el polipéptido en esas células. Los ejemplos de un promotor de ese tipo incluyen, entre otros, el promotor de SV40 (Mulligan *et al.*, Nature (1979) 277, 108), el promotor de MMLV-LTR, el promotor de EF1 α (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) y el promotor de CMV.

Más preferentemente, el vector también tiene genes para seleccionar células transformadas (p. ej., genes de resistencia a fármacos que permiten la discriminación con fármacos tales como neomicina o G418). Los ejemplos de vectores que tienen estas propiedades incluyen, entre otros, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Además, cuando se pretende la expresión estable de un gen de interés y la amplificación intracelular del número de copias del gen, se puede usar el procedimiento siguiente. Brevemente, en células CHO que carecen de un ruta de síntesis de ácidos nucleicos, se introduce un vector que tiene un gen DHFR que complementa la carencia (p. ej., pCHOI), seguido de la amplificación con metotrexato (MTX). Por otro lado, cuando se pretende la expresión provisional de un gen de interés, se puede usar un procedimiento en el cual se transforman células COS portadoras de un gen que expresa el antígeno SV40T en el cromosoma con un vector que tiene el origen de replicación del SV40 (p. ej., pcD). Como origen de replicación también se puede usar un origen de replicación derivado de poliomavirus, adenovirus o papilomavirus bovino (PVB). Además, el vector de expresión puede contener marcadores seleccionables para amplificar el número de copias del gen en un sistema de célula huésped. Los ejemplos de estos marcadores seleccionables incluyen, entre otros, el gen aminoglucósido fosfotransferasa (APH), el gen timidina cinasa (TK), el gen xantina-guanina fosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt) y el gen dihidrofolato reductasa (dhfr).

La presente invención también proporciona una célula huésped como se define en las reivindicaciones en la cual se ha transferido el vector. La célula huésped en la cual se transfiere el vector de la presente descripción no está particularmente limitada. Por ejemplo, se pueden usar *E. coli* o células de diversos animales. La célula huésped como se define en las reivindicaciones se puede usar, por ejemplo, como sistema de producción para preparar o expresar el polipéptido de la presente descripción. Además, la célula huésped de la presente invención es capaz de expresar fuertemente el transportador de taurina, promover la incorporación de taurina y aumentar el rendimiento del polipéptido deseado. Para producir el polipéptido, existen sistemas de producción *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos de sistemas de producción *in vitro* incluyen sistemas que usan eucariotas y sistemas que usan procariotas.

5 Cuando se usan eucariotas, se pueden usar como huéspedes células animales, células vegetales, células fúngicas, etc. Los ejemplos específicos de células animales incluyen células de mamíferos, tales como células CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), células COS, células 3T3, células de mieloma, células BHK (células renales de cría de hámster), células HeLa y células Vero; células de anfibio, tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al.*, Nature (L981) 291, 358-340);
 10 o células de insectos, tales como células sf9, sf21 y Tn5. Entre las células CHO, se usan con especial ventaja las CHO dhfr-, que carecen del gen DHFR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4216-4420), y las CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275). Cuando se pretende una expresión alta en una célula animal, se prefieren especialmente células CHO. La introducción del vector de expresión en la célula huésped se pueden realizar mediante procedimientos tales como el procedimiento de fosfato de calcio, el procedimiento de DEAE dextrano, un procedimiento que usa un DOTAP de ribosoma catiónico (Boehringer-Mannheim), electroporación, lipofección, etc.

Como células vegetales para la producción de polipéptido, se conoce una célula derivada de *Nicotiana tabacum* como sistema de producción de polipéptido y se puede someter a cultivo de callos. Como células fúngicas para la producción de polipéptido, los ejemplos específicos incluyen levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, y hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus niger*.

15 Cuando se usan procariotas, se conocen sistemas de producción que usan células bacterianas. Los ejemplos específicos de tales células bacterianas incluyen *E. coli* (tales como JM109, DH5 α , HB101) y *Bacillus subtilis*.

El polipéptido codificado por un gen de interés se pueden obtener transformando estas células con el gen de interés y cultivando las células transformadas *in vitro*. El cultivo se puede realizar mediante procedimientos conocidos. Por ejemplo, como caldo de cultivo para células animales, se puede usar un medio tal como DMEM, MEM, RPMI1640 o IMDM. Se
 20 puede usar conjuntamente un complemento de suero tal como suero fetal bovino (FCS). De forma alternativa, se puede realizar un cultivo sin suero. Preferentemente, el pH durante el cultivo es de aproximadamente 6 a 8. Habitualmente, el cultivo se realiza a aproximadamente 30-40 °C durante aproximadamente 15-200 horas. Si es necesario, se llevan a cabo el reemplazo del medio, aireación y agitación.

Por otro lado, los sistemas de producción *in vivo* incluyen los que usan animales o vegetales. Se transfiere un gen de interés en estos animales o vegetales para producir el polipéptido en los organismos animales o los organismos vegetales. Después, se recoge el polipéptido. Como se usa en el presente documento el término "huésped" incluye estos animales o
 25 vegetales.

Cuando se usan animales, los sistemas de producción disponibles incluyen los que usan mamíferos o insectos. Como mamíferos se pueden usar cabras, cerdos, ovejas, ratones y bóvidos (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Cuando se usan mamíferos, se pueden usar mamíferos transgénicos.
 30

En primer lugar, se fusiona un gen de interés con un gen que codifica un polipéptido producido de forma inherente en la leche (tal como β -caseína de cabra) para, de este modo, preparar un gen de fusión. Se inyecta un fragmento de ADN que contiene este gen de fusión en un embrión de cabra, que después se implanta en el útero de una cabra hembra. El polipéptido de interés se puede obtener a partir de la leche producida por cabras transgénicas nacidas de la cabra que
 35 aceptó el embrión o la descendencia de las cabras transgénicas. Con el fin de aumentar el rendimiento de leche que contiene el polipéptido producida por las cabras transgénicas, se pueden administrar hormonas de forma apropiada a las cabras transgénicas (Ebert, K. M. *et al.*, Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

Los ejemplos de insectos que se pueden usar incluyen el gusano de seda. En este caso, el gusano de seda se infecta con un baculovirus portador de un gen transferido que codifica el polipéptido de interés. El polipéptido de interés se puede
 40 obtener a partir del fluido corporal del gusano de seda (Susumu, M. *et al.*, Nature (1985) 315, 592-594).

Además, cuando se usan vegetales, normalmente se puede usar el tabaco. Cuando se usa el tabaco, se inserta un gen que codifica el polipéptido de interés en un vector de expresión vegetal (p. ej., pMON 530), que se transfiere después en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Se infecta una planta de tabaco (p. ej., *Nicotiana tabacum*) con la bacteria resultante. El polipéptido de interés se puede obtener a partir de hojas de esta planta (Julian, K-C. Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).
 45

El polipéptido así obtenido se puede aislar a partir del interior de la célula huésped o del exterior (p. ej., el medio), y purificarse hasta un polipéptido homogéneo y sustancialmente puro. El aislamiento y la purificación de polipéptidos se pueden realizar usando procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de polipéptidos, y no están limitados en modo alguno. Por ejemplo, se pueden aislar y purificar polipéptidos seleccionando y combinando de forma apropiada
 50 diversas herramientas y técnicas, tales como columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, desalado, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, enfoque isoeléctrico, diálisis, recristalización, etc.

Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, etc. (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas técnicas cromatográficas se pueden llevar a cabo usando cromatografía líquida, por ejemplo, HPLC, FPLC, etc. La presente descripción también incluye los polipéptidos altamente purificados usando estos procedimientos de purificación.
 55

Antes o después de la purificación, también se pueden dar modificaciones opcionales al polipéptido o eliminar un péptido parcial del mismo, haciendo reaccionar el polipéptido con una enzima de modificación de polipéptidos apropiada. Los ejemplos de enzimas de este tipo incluyen, entre otras, tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasa, proteína cinasa y glucosidasa.

5 También se divulga un anticuerpo que se une al polipéptido de la presente descripción. La forma del anticuerpo de la presente descripción no está particularmente limitada; el anticuerpo de la presente descripción incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Además, también se incluyen en el anticuerpo de la presente descripción antisueros obtenidos inmunizando animales inmunes tales como conejos con el polipéptido de la presente descripción y anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales de todas las clases.

10 El polipéptido usado como antígeno de sensibilización puede ser un polipéptido intacto o un péptido parcial del mismo. Los ejemplos de estos péptidos parciales incluyen fragmentos amino terminales (N) y fragmentos carboxilo terminales (C) del polipéptido. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que reacciona con el polipéptido de longitud completa o fragmentos del mismo.

15 Después de insertar un gen que codifica el polipéptido usado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención o un fragmento del mismo en un vector de expresión conocido y transformar la célula huésped descrita anteriormente en la presente memoria descriptiva con este vector de expresión, se obtiene el polipéptido deseado o un fragmento del mismo a partir del interior y el exterior de las células huésped mediante un procedimiento conocido. Este polipéptido o un fragmento del mismo se pueden usar como antígeno de sensibilización. De forma alternativa, también se pueden usar como agente de sensibilización células que expresan el polipéptido de la presente descripción o un lisado de las mismas, o un
20 polipéptido de la presente invención sintetizado químicamente.

Aunque no existe ninguna limitación en particular sobre la especie que se va a inmunizar con un antígeno de sensibilización, es preferible seleccionar mamíferos teniendo en cuenta la compatibilidad con la célula original que se va a usar para la fusión celular y, en general, se usan animales de los roedores, lagomorfos y primates.

25 Por ejemplo, se usan ratón, rata, hámster y similares como animales roedores; se usa el conejo como animal lagomorfo y se usa el mono como animal primate. Entre los monos, se usan monos catarrinos (monos de Viejo Mundo), ejemplificados por el macaco de Java (*Macaca fascicularis*), el macaco rhesus, los babuinos, el chimpancé y similares.

30 La inmunización de los animales con un antígeno de sensibilización se lleva a cabo de acuerdo con cualquier procedimiento conocido. En general, la inmunización se realiza mediante inyección intraperitoneal o subcutánea del antígeno en los mamíferos. Específicamente, el antígeno se diluye y se suspende en PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similar, opcionalmente se mezcla con una cantidad adecuada de un adyuvante habitual (p. ej., adyuvante completo de Freund), se emulsiona y después se administra a los mamíferos, preferentemente seguido de varias inyecciones de refuerzo del antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freund cada de 4 a 21 días. Además, se pueden usar vehículos adecuados en el momento de la inmunización con el
35 antígeno. Posteriormente, la elevación del nivel de un anticuerpo deseado en los sueros de animales se confirma mediante un procedimiento convencional.

40 Con el fin de obtener anticuerpos policlonales frente al polipéptido de la presente descripción, se extrae la sangre de mamíferos sensibilizados con el antígeno tras confirmar la elevación del nivel de un anticuerpo deseado en los sueros. Después, se aíslan los sueros a partir de la sangre mediante un procedimiento conocido. Un suero que contiene un anticuerpo policlonal se puede usar como el anticuerpo policlonal. Si es necesario, se puede aislar adicionalmente a partir del suero una fracción que contiene el anticuerpo policlonal y usarse como el anticuerpo policlonal. Por ejemplo, usando una columna de afinidad a la cual se ha acoplado el polipéptido de la presente descripción se obtiene una fracción que reconoce únicamente el polipéptido de la presente descripción, y se purifica adicionalmente usando una columna de proteína A o proteína G para preparar inmunoglobulina G o M.

45 Se pueden obtener anticuerpos monoclonales eliminando inmunocitos de los mamíferos sensibilizados con el antígeno descrito anteriormente, tras confirmar la elevación del nivel de un anticuerpo deseado en sus sueros, y sometiendo después los inmunocitos a fusión celular. Preferentemente, los inmunocitos usados para la fusión celular son células del bazo. Preferentemente, las células originales que se van a fusionar con los inmunocitos descritos anteriormente son células de mieloma de mamíferos, más preferentemente células de mieloma que han adquirido características para la selección de células fusionadas con fármacos.

50 La fusión celular entre los inmunocitos descritos anteriormente y células de mieloma se puede llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido, por ejemplo, el procedimiento de Milstein *et al.* (Galfre, G y Milstein, C, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46).

55 Los hibridomas así obtenidos por fusión celular se seleccionan cultivándolos en un medio de selección convencional, por ejemplo, medio de cultivo HAT (caldo de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en medio HAT continúa durante un tiempo suficiente para destruir células (células no fusionadas) que no son los hibridomas deseados, habitualmente durante de varios días a varias semanas. Después, se realiza un procedimiento convencional de dilución de cultivo limitante para llevar a cabo el rastreo y la clonación de hibridomas que producen el anticuerpo de interés.

Posteriormente, se trasplantan los hibridomas resultantes en las cavidades abdominales de ratones y se recogen las ascitis de los ratones para, de este modo, obtener anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales se pueden purificar por precipitación con sulfato de amonio, con columnas de proteína A o proteína G, mediante cromatografía de intercambio iónico con DEAE, con una columna de afinidad a la cual se ha acoplado el polipéptido de la presente descripción, etc. El anticuerpo de la presente descripción se puede usar para la purificación y la detección del polipéptido de la presente descripción.

Además, los anticuerpos monoclonales así obtenidos también se pueden preparar como anticuerpos recombinantes usando técnicas de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Borrebaeck, C. A. K. y Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Un anticuerpo recombinante se produce clonando un gen que codifica el anticuerpo recombinante a partir de hibridomas o inmunocitos productores del anticuerpo (tales como linfocitos sensibilizados), incorporando el gen en un vector apropiado y transfiriendo el vector en células huésped para la producción de anticuerpos. El anticuerpo recombinante producido también se incluye en la presente descripción.

El anticuerpo de la presente descripción puede ser fragmentos de anticuerpo o anticuerpos modificados, siempre que sean capaces de unirse al polipéptido de la presente descripción. Los ejemplos de estos fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv o un Fv monocatenario (scFv) preparado enlazando el Fv de la cadena H al Fv de la cadena L por medio de un enlazador adecuado (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). Específicamente, los fragmentos de anticuerpo se producen digiriendo el anticuerpo con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina; o construyendo un gen que codifica dicho fragmento, insertando el gen en un vector de expresión y expresándolo en una célula huésped adecuada (véanse, por ejemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M y Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Chickthun, A y Skerra, A, Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W, Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Como anticuerpo modificado, también se puede usar el anticuerpo unido a diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). El "anticuerpo" de la presente descripción también incluye estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados se pueden preparar modificando químicamente el anticuerpo obtenido como se describe anteriormente. Estos procedimientos de modificación ya se han establecido en la técnica.

Los anticuerpos obtenidos como se describe anteriormente se pueden purificar hasta que sean homogéneos. Para el aislamiento y la purificación del anticuerpo usado en la presente descripción, se puede usar cualquier procedimiento de aislamiento y purificación usado para polipéptidos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar columnas de cromatografía tales como columnas de cromatografía de afinidad, filtros, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS, enfoque isoeléctrico, etc. de forma independiente o en combinaciones apropiadas (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), pero no son los únicos ejemplos. La concentración del anticuerpo obtenido como se describe anteriormente se puede determinar midiendo la absorbancia o mediante un procedimiento tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los ejemplos de columnas usadas en cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Como columnas que usan proteína A, se pueden dar Hyper D, POROS, sefarsa F.F. (Farmacia), etc.

Los ejemplos de cromatografía distinta de la cromatografía de afinidad incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, etc. (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas técnicas cromatográficas se pueden llevar a cabo usando cromatografía de fase líquida tal como HPLC, FPLC, etc.

Además, se pueden usar ELISA, EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) o técnicas de anticuerpos fluorescentes como procedimientos para medir la actividad de unión a antígeno del anticuerpo de la presente descripción. Cuando se usa ELISA, el polipéptido de la presente descripción se añade a placas sobre las que se ha inmovilizado el anticuerpo de la presente descripción y después se añade a las placas una muestra que contiene un anticuerpo de interés (p. ej., sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpo purificado). Se añade a las placas un anticuerpo secundario marcado con una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina) que reconoce el anticuerpo. Tras incubar y lavar las placas, se añade un sustrato para la enzima (p. ej., p-nitrofenil fosfato) para determinar la absorbancia y, de este modo, evaluar la actividad de unión a antígeno. En lugar del polipéptido entero se puede usar un fragmento del mismo. Por ejemplo, se pueden usar fragmentos que comprenden su extremo C-terminal o N-terminal. Para evaluar la actividad del anticuerpo de la presente descripción se puede usar BIAcore (Farmacia).

Ejemplos

A continuación en el presente documento se describirá con más detalle la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos. Cabe destacar que estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención y no para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1. Clonaje del gen transportador de taurina de hámster derivado de células CHO

Se extrajo ARN total a partir de células productoras de anticuerpos anti-receptor de IL-6 (línea celular A CHO DXB11 en la cual se había transferido un gen de anticuerpo anti-receptor de IL-6) (en la publicación de patente japonesa no examinada N.º Hei 8-99902) y después se sintetizó ADNc a partir de él de forma dependiente de poli(A). Se obtuvo el gen de transportador de taurina de hámster (TauT) por PCR usando como molde el ADNc fragmentado con tres enzimas de restricción, Sall, XhoI y EcoRI. Como cebadores de PCR, se diseñaron aquellos que contenían la secuencia del extremo 5' y del extremo 3' conservada entre los TauT de rata y ratón. Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen clonado. A partir de su homología con otros genes TauT de especies conocidas, se confirmó que el gen clonado codificaba el TauT de hámster (fig. 1). La secuencia de aminoácidos del TauT de hámster tiene una homología alta con el TauT de ratón (96 % de identidad), el TauT de rata (96 % de identidad) y el TauT humano (93 % de identidad); se predijo que el TauT de hámster es un transportador con 12 regiones transmembrana (fig. 2).

Ejemplo 2. Aumento de la densidad de células viables, inhibición de la producción de lactato y aumento del rendimiento de anticuerpo, provocado por la transferencia del transportador de taurina de hámster

Se construyó el plásmido pHyg/TauT de expresión del promotor del CMV (fig. 3) añadiendo la secuencia de Kozak al gen TauT de hámster (en lo sucesivo, TauT) obtenido por clonación en el ejemplo 1. Se introdujeron el plásmido de control pHyg sin pHyg/TauT o el gen TauT por electroporación en la cepa original de la célula CHO productora de anticuerpo anti-glicoproteína-3 (véase el documento WO 2006/006693). Tras la selección de las células transferidas con el plásmido de expresión en presencia de higromicina (400 µg/ml), se expandieron todas las cepas de la célula con crecimiento estable (pHyg/TauT: 8 cepas; pHyg: 7 cepas). Se preparó ARNm de TauT. Posteriormente, se confirmó que 7 cepas expresaban TauT más fuertemente que la cepa original por el procedimiento TaqMan; se seleccionaron como células transferidas con pHyg/TauT. El nivel medio de expresión de ARNm de estas células transferidas (7 cepas) fue aproximadamente 40 veces mayor que el del control (7 cepas). Las células de las 14 cepas totales se sometieron a cultivo discontinuo y cultivo semicontinuo en matraces de agitación de 50 ml con una densidad celular inicial de 2×10^5 células/ml. En el día 7 de cultivo (etapa tardía), se compararon las densidades de células viables, los rendimientos de lactato y los rendimientos de anticuerpo anti-glicoproteína-3 en esas cepas. En el cultivo discontinuo, se acumulan sustancias inhibitorias del crecimiento tales como lactato en el caldo de cultivo a medida que crecen las células y se inhibe su crecimiento. Sin embargo, las densidades de células viables (fig. 4) y los rendimientos de lactato (fig. 5) en células transferidas con pHyg/TauT fueron superiores a los de las células transferidas con pHyg (prueba de la t; $p < 0,05$). Con respecto al rendimiento de anticuerpo anti-glicoproteína-3, 4 de las 7 cepas de la célula transferida con pHyg/TauT mostraron rendimientos de anticuerpo mayores que el rendimiento más alto de la célula transferida con pHyg (fig. 6). Además, dado que la superioridad de las células transferidas con pHyg/TauT en el rendimiento de anticuerpo anti-glicoproteína-3 se hizo más evidente (prueba de la t; $P < 0,01$; fig. 7) en cultivo discontinuo, la cepa T10 transferida con pHyg/TauT (que mostró la mayor capacidad de crecimiento entre las 4 cepas anteriores) y la cepa original se sometieron a cultivo discontinuo en frasco de 1 l. Como consecuencia, la proporción viable de T10 se mantuvo al 80 % o más incluso en el día 32 de cultivo (fig. 8), con inhibición de la producción de lactato. En consecuencia, su rendimiento de anticuerpo anti-glicoproteína-3 alcanzó los 2,9 g/l en el día 35 de cultivo (fig. 9). Se confirmó por análisis de citometría de flujo que la célula T10 transferida con TauT expresaba moléculas de TauT sobre la membrana celular (fig. 10). Estos resultados indican que, expresando TauT de hámster de forma artificial, se puede elevar el potencial de las células productoras de anticuerpos y crear cepas capaces de potenciar la producción de anticuerpos.

Ejemplo 3. Inhibición de producción de amoníaco, incorporación de taurina, aumento del consumo de glutamina y rendimiento de anticuerpo no dependiente de taurina en cepas transferidas con TauT de hámster

La cepa original y la cepa transferida con pHyg/TauT se sometieron a cultivo semicontinuo en frasco de 1 l con una densidad celular inicial de 2×10^5 células/ml. Se tomó del frasco una parte del caldo de cultivo que contenía 450×10^5 células en puntos temporales apropiados. Después de separar el sobrenadante de cultivo por centrifugación, se añadió 1 ml de agua estéril enfriada que contenía un inhibidor de proteasa (Complete Mini; Roche Diagnostics; comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa) al sedimento celular. Después, las células se rompieron totalmente en hielo con un sonicador (MISOMX ASTRASON MODELO XL2020) repitiendo 12 veces un juego de un pulso de 5 segundos de encendido y un pulso de 5 segundos de apagado. El volumen total de las células así tratadas se aplicó a una unidad de filtro de centrifuga para, de este modo, preparar un filtrado con un peso molecular de 5000 o menos. Este filtrado se usó como muestra para determinar los aminoácidos intracelulares. Se sometió cada muestra a detección y comparación de la absorbancia a 570 nm usando un dispositivo de L-8500 de reactivo de ninhidrina (Wako PureChemical Industries) y un modelo mejorado de analizador de aminoácidos totalmente automático de Hitachi (L-8500). Por tanto, se determinaron diversas concentraciones de aminoácido en las muestras. Dado que las concentraciones de aminoácidos y amoníaco en caldo de cultivo eran valores medidos directamente, se realizaron comparaciones de concentración en el orden de µM. Por otro lado, dado que las concentraciones intracelulares se obtuvieron tras la adición de 1 ml de agua estéril enfriada al precipitado celular y la sonicación del mismo, las concentraciones medidas de diversos aminoácidos y amoníaco se convirtieron en valores por célula, seguido de la comparación de los valores convertidos. Para determinar las proporciones de concentración de amoníaco mostradas en la fig. 11, se tomó como 1 el valor de amoníaco detectado por 450×10^5 células de la cepa original al inicio del cultivo semicontinuo en frasco de 1 l y se comparó con valores detectados al inicio del cultivo y en los días 6, 12 y 18 del cultivo de la cepa transferida. Los valores de taurina de la fig. 12 y los valores de glutamina de la fig. 13 también se determinaron mediante el análisis de aminoácidos descrito anteriormente.

Como consecuencia, el amoníaco intracelular en la cepa transferida con pHyg/TauT se mantuvo a una concentración baja en la etapa tardía de cultivo; se cree que esto contribuye a un rendimiento de anticuerpo alto (fig. 11).

5 Las proporciones de concentración de taurina intracelular se determinaron de la misma manera descrita anteriormente para las concentraciones de amoníaco (fig. 12), excepto porque se tomó como 1 el valor de amoníaco detectado por 200×10^5 células de la cepa original en el día 4 de cultivo discontinuo en agitador de 50 ml.

10 Como consecuencia, se descubrió que la cepa transferida con pHyg/TauT había incorporado taurina de una manera dependiente de la cantidad de taurina añadida y que esta incorporación era casi igual a la de la cepa original. Sin embargo, como se muestra en la fig. 13, el consumo de glutamina en la cepa transferida con pHyg/TauT fue notablemente alto en comparación con la cepa original y no fue dependiente de la concentración inicial de taurina. Se ha informado de que la glutamina mejora el crecimiento celular, la tasa de supervivencia y la capacidad de producción de anticuerpo en hibridomas para, de este modo, elevar sus rendimientos de anticuerpo (Enzyme and Microbial Technology 17:47-55, 1995). Por lo tanto, el efecto de potenciación de la producción de anticuerpo de la cepa transferida con pHyg/TauT puede estar provocado por la incorporación mediada por el transportador de taurina de aminoácidos distintos de taurina (p. ej., glutamina). Las concentraciones de glutamina se obtuvieron convirtiendo los valores determinados por análisis de aminoácidos del caldo de cultivo en el día 4 de cultivo en la fig. 12 en valores por 1×10^5 células.

15 En realidad, el rendimiento de anticuerpo anti-glicano-3 no dependió de la concentración inicial de taurina (0-500 mM (62,575 g/l)) al inicio del cultivo semicontinuo en agitador de 50 ml (fig. 14). No se observó ninguna diferencia significativa en las cepas originales en el efecto de la concentración inicial de taurina sobre el rendimiento de anticuerpo.

20 Los resultados descritos hasta el momento indican que las cepas que expresan TauT fuertemente tienen una capacidad de producción de anticuerpo alta incluso si el medio no contiene taurina al inicio del cultivo y existe la posibilidad de que estas cepas también promuevan la incorporación de aminoácidos distintos de taurina.

Las presente invención es aplicable a cualquier célula productora de anticuerpos.

Aplicabilidad industrial

Las presente invención es aplicable a la producción de polipéptidos.

25 Listado de secuencias, texto libre

<SEQ ID NO: 1>

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el transportador de taurina de hámster.

<SEQ ID NO: 2>

30 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster.

<SEQ ID NO: 3>

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el transportador de taurina de rata.

<SEQ ID NO: 4>

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de rata.

35 <SEQ ID NO: 5>

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el transportador de taurina de ratón.

<SEQ ID NO: 6>

La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de ratón.

<SEQ ID NO: 7>

40 La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el transportador de taurina humano.

<SEQ ID NO: 8>

La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina humano.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

<120> Gen transportador de taurina

5 <130> FP-079PCT

<150> JP P2006\2011\110467

10 <151> 13-04-2006

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1869

<212> ADN

20 <213> Cricetulus griseus

<400> 1

```

atggccacca aggagaagct gcagtgtctg aaagacttcc acaaagacat cctgaagcct 60
tctccagggg agagcccagg cacacggcct gaggatgagg ctgaggggaa gccccctcag 120
agggagaagt ggtccagcaa gattgacttt gtgctgtctg tggccggagg ctctgtgggt 180
ttgggcaacg tttggcgttt cccgtacctc tgctacaaaa atggtggagg tgctttcctc 240
ataccgtatt ttattttctt gtttgggagt ggcctgcctg tgtttttcct ggaggtcata 300
ataggccagt acacctcaga agggggaatc acctgctggg agaagatctg ccccttggtc 360
tctggcattg gctacgcata catcgtcata gtgtccctcc tgaatgtgta ctacattgtc 420
atcctggcct gggccacata ctacctattt cactccttcc agacagagct tccttgggcc 480
cactgcaacc acagctggaa cacaccacat tgcattggagg acaccctgcg taggaatgag 540
agtctctggg tctcccttag cgctccaac ttcacctcgc ctgtcatcga gttctgggag 600
cgcaatgtac tcagcctgtc ttccggaatc gacgaaccag gcgctctgaa atgggacctt 660
gcgctctgcc tcctcttagt ctggcttgtc tgttttttct gcatatggaa ggggtgtcga 720
tccacagcca aggttgtcta cttcaccgcc actttcccgt ttgccatgct tctgggtgctg 780
ctggtccgtg gactgaccct gccgggtgct ggcgaaggca tcaaattcta cctgtaccct 840
gacatcagcc gccttgagga cccacaggtg tggatcgacg ccggaaccca gatattcttt 900
tcctatgcca tctgcttggg ggccatgacc tcactgggaa gctacaacaa gtacaagtat 960
aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgectgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020
ggcttcgcag ttttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080
gatgtggctg agtcaggctc tggcttggcc ttcattgcct atccaaaagc tgtgactatg 1140
atgcccgtgc ccaccttttg gtccattctg ttttttatta tgctcctctt gcttggactg 1200
gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tggttgatct ttaccctgct 1260
ttcctaagga agggttatcg tcgggaagtc ttcacgcca tcctgtgtag catcagctac 1320
ctgctggggc tgtcgatggt gacggagggt ggcattgatg tgtttcaact ctttgactac 1380
tatgcagcta gtggtgtatg cetttttgtg gttgcattct ttgaatgttt tgttattgcc 1440
tggatatatg gtggtgataa cttatatgac ggtattgagg acatgattgg ctatcggcct 1500
gggccctgga tgaagtacag ctgggctgtc atcactccag ttctctgtgc tggatgtttc 1560
atottctctc ttgtcaagta tgtaccctcg acctacaaca aagtctacgt gtatcctgat 1620
tgggcaattg ggctgggctg gggcctggcc ctatcctcca tgggtgtgat ccccttgggtc 1680
attgccatcc tcctctgccc gacggaggga ccgctccgcg tgagaatcca atacctgata 1740
acccccaggg agcccaaccg ctgggctgtg gagcgtgagg gggccacacc cttccactcc 1800
cgcaacaagg tcgtcatgaa cggcgcactc atgaaaccca gtcacgtcat tgtggagacc 1860
atgatgtga
    
```

25 <210> 2

<211> 622

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

30 <400> 2

Met Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 1 5 10 15

Ile Leu Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu Asp
 20 25 30
 Glu Ala Glu Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser Lys Ile
 35 40 45
 Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu Gly Asn Val
 50 55 60
 Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly Leu Pro Val Phe Phe
 85 90 95
 Leu Glu Val Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser Glu Gly Gly Ile Thr Cys
 100 105 110
 Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Ile
 115 120 125
 Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp
 130 135 140
 Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe His Ser Phe Gln Thr Glu Leu Pro Trp Ala
 145 150 155 160
 His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Leu
 165 170 175
 Arg Arg Asn Glu Ser Leu Trp Val Ser Leu Ser Ala Ser Asn Phe Thr
 180 185 190
 Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Gly Ile Asp Glu Pro Gly Ala Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Leu Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Trp Lys Gly Val Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met
 245 250 255
 Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Glu
 260 265 270
 Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Glu Asp Pro
 275 280 285
 Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser Tyr Ala Ile
 290 295 300
 Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys Leu Asn Ser Gly Thr
 325 330 335
 Ser Phe Val Ser Gly Phe Ala Val Phe Ser Ile Leu Gly Phe Met Ala
 340 345 350
 Gln Glu Gln Gly Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly
 355 360 365

Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Lys Ala Val Thr Met Met Pro Leu Pro
 370 375 380
 Thr Phe Trp Ser Ile Leu Phe Phe Ile Met Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Gln Phe Val Glu Val Glu Gly Gln Ile Thr Ser Leu Val Asp
 405 410 415
 Leu Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu Val Phe Ile
 420 425 430
 Ala Ile Leu Cys Ser Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Ser Met Val Thr
 435 440 445
 Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser
 450 455 460
 Gly Val Cys Leu Leu Trp Val Ala Phe Phe Glu Cys Phe Val Ile Ala
 465 470 475 480
 Trp Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile
 485 490 495
 Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Ala Val Ile Thr
 500 505 510
 Pro Val Leu Cys Ala Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val
 515 520 525
 Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Val Tyr Val Tyr Pro Asp Trp Ala Ile Gly
 530 535 540
 Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys Ile Pro Leu Val
 545 550 555 560
 Ile Ala Ile Leu Leu Cys Arg Thr Glu Gly Pro Phe Arg Val Arg Ile
 565 570 575
 Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg
 580 585 590
 Glu Gly Ala Thr Pro Phe His Ser Arg Thr Ser Leu Val Met Asn Gly
 595 600 605
 Ala Leu Met Lys Pro Ser His Val Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615 620

<210> 3

<211> 1866

5 <212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 3

atggccacca aggagaagct tcaatgtctg aaagacttcc acaaagacat cctgaagcct 60
 tctccaggga agagcccagg cacgcggcct gaggatgagg ctgatgggaa gccccctcag 120
 agggagaagt ggtccagcaa gatcgacttt gtgetgtctg tggccggagg cttegtgggt 180
 ttgggcaatg tctggcgttt cccgtacctc tgctacaaaa atgggtggagg tgcattcctc 240
 ataccgtatt ttattttcct gtttgggagc ggctgtcctg tgtttttcct ggaggtcatc 300
 ataggccagt acacctcaga agggggcacc acctgtctgg agaagatctg ccccttgctc 360
 tctggcattg gctacgcgtc catcgtcacc gtgtccctcc tgaatgtgta ctacatcgtc 420
 atcctggcct gggccacata ctacctatc cagtctttcc agaaggatct tccttgggcc 480
 cactgcaacc atagctggaa cacgccacag tgcattggagg acaccctgcg taggaacgag 540

```

agtcactggg tctcccttag cgcgcgcaac ttcacttcgc ctgtgatoga gttctgggag 600
cgcaacgtgc tcagcctgtc ctccggaatc gaccaccag gcagtctgaa atgggacctc 660
ggctctgccc tctctttagt ctggctcgtc tgtttttct gcactctgaa ggggtgtcgg 720
tccacaggca aggttgtcta cttcactgct actttcccgt ttgccatgct tctgggtgctg 780
ctggtcctg gactgacct gccaggtgct ggtgaaggca tcaaattcta cctgtacct 840
aacatcagcc gccttgagga cccacaggtg tggatcgacg ctggaactca gatattcttt 900
tcctacgcta tctgcctggg ggccatgacc tcactgggaa gctataacaa gtacaagtat 960
aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgccctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020
ggcttcgcaa tttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080
gatgtggctg agtcaggtcc tggcttgccc ttcattgcct acccaaaagc tgtgaccatg 1140
atgccgctgc ccacctttg gtccattctg tttttatta tgcctctctt gcttggactg 1200
gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tggttgatct ttaccctgct 1260
ttcctaagga agggttatcg tcgggaaatc ttcattgcca tcgtgtgcag catcagctac 1320
ctgctggggc tgacgatggt gacggagggt ggcatgtatg tgtttcaact ctttgactac 1380
tatgcagcta gtggtgatg ccttttgtgg gtcgcattct ttgaatgttt tgttattgcc 1440
tggatataag gcgggtataa cttatatgac ggtattgagg acatgatcgg ctatcggcct 1500
ggacctgga tgaagtacag ctgggctgct atcactccag ctctctgtgt tggatgtttc 1560
atcttctctc tcgtcaagta tgtaccctg acctacaaca aagtctaccg gtaccctgat 1620
tgggcaatcg ggetgggctg gggcctggcc ctttctcca tgggtgtgat ccccttggtc 1680
attgtcatcc tcctctgccc gacggaggga ccgctccgcg tgagaatcaa atacctgata 1740
acccccaggg agcccaaccg ctgggctgtg gagcgtgaag gggctacgcc ctttactcc 1800
agagcaaccc tcatgaacgg tgcactcatg aaaccagtc acgtcattgt ggagaccatg 1860
atgtga

```

<210> 4

<211> 621

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

```

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

```


Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Val Tyr Arg Tyr Pro Asp Trp Ala Ile Gly
 530 535 540

Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys Ile Pro Leu Val
 545 550 555 560

Ile Val Ile Leu Leu Cys Arg Thr Glu Gly Pro Leu Arg Val Arg Ile
 565 570 575

Lys Tyr Leu Ile Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg
 580 585 590

Glu Gly Ala Thr Pro Phe His Ser Arg Ala Thr Leu Met Asn Gly Ala
 595 600 605

Leu Met Lys Pro Ser His Val Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615 620

<210> 5
 <211> 1866
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 5
 atggccacga aggagaagct gcaatgtctg aaagacttcc acaaagacat cctgaagcct 60
 tctccagggg agagcccagg cacacggcct gaagatgagg cggacgggaa gccccctcag 120
 agggagaagt ggtccagcaa gatcgacttt gtgctgtctg tggccggagg ctctcgtgggt 180
 ttgggcaacg tctggcgttt cccgtacctc tgctacaaaa atgggtggagg tgcgttcctc 240
 ataccgtatt ttattttcct gtttgggagc ggccctgctg tgtttttctt ggaggtcatc 300
 ataggccagt acacatcaga agggggcacc acctgctggg agaagatctg tcctttgttc 360
 tctggcattg gctacgcacc catcgtcatt gtgtccctcc tgaacgtgta ctacatcgtc 420
 atcctggcct gggccacata ctacctatcc cactctttcc agaaggatct tccttgggcc 480
 cactgcaacc atagctggaa cacaccacag tgcattggagg acaccctgcg taggaacgag 540
 agtcactggg tctcccttag cactgccaac ttcacctcac ccgtcatcga gttctgggag 600
 cgcaatgtgc tcagcctgtc ctccggaaac gacaaccacg gcagctcga atgggacctc 660
 gcgctctgca tcctcttagt ctggctcgtc tgtttttctt gcactcggaa ggggtgttcga 720
 tccacaggca aggttgctca cttcaccgct accttcccgt ttgccatgct tctgggtgctg 780
 ctggctccgtg gactgaccct gccaggtgct ggtgaaggca tcaaattcta cctgtaccct 840
 gacatcagcc gccttgggga cccacaggtg tggatcgacg ctggaactca gatattcttt 900
 tectacgcaa tctgcctggg ggccatgacc tccactgggaa gctataacaa gtacaagtat 960
 aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgcctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020
 ggcttcgcaa tttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080
 gatgtggctg agtcaggctc tggcttggcc ttcatgtcct acccaaaagc tgtaaccatg 1140
 atgcccgtgc ccaccttttg gtctattctg tttttcatta tgctcctctt gcttggactg 1200
 gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tggttgatct ttaccctgct 1260
 ttccctaagga agggttatcg tcgggaaatc ttcatagcca tcttgtgtag catcagctac 1320
 ctgctggggc tgacgatggt gacggagggt ggcatgtatg tgtttcaact ctttgactac 1380
 tatgcageta gtggtgtatg ccttttgtgg gttgcattct ttgaatggtt tgttattgcc 1440
 tggatatatg gcggtgataa ottatatgac ggtattgagg acatgattgg ctatcggcct 1500
 gggcccttga tgaagtacag ctgggctgtc atcactccag ctctttgtgt tggatgtttc 1560
 gtcttctcgc ttgtcaagta tgtaccctg acctacaaca aagtgtaccg gtaccctgat 1620
 tgggcaattg ggetgggctg gggcctggcc ctttctcca tgetgtgtat ccccttggtc 1680
 attgtcatcc tcctctgcg gacggaggga ccgctccgct tgagaatcaa atacctgata 1740
 acccccaggg agccaaccg ctgggctgtg gagcgtgaag gggccacacc ctttactcc 1800
 cgagtaacc tcatgaacgg cgcactcatg aaaccagtc acgtcattgt ggagaccatg 1860
 atgtga 1866

10
 <210> 6
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 6

Met Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Leu Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu Asp
 20 25 30
 Glu Ala Asp Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser Lys Ile
 35 40 45
 Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu Gly Asn Val
 50 55 60
 Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly Leu Pro Val Phe Phe
 85 90 95
 Leu Glu Val Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser Glu Gly Gly Ile Thr Cys
 100 105 110
 Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Ile
 115 120 125
 Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp
 130 135 140
 Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe His Ser Phe Gln Lys Asp Leu Pro Trp Ala
 145 150 155 160
 His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro Gln Cys Met Glu Asp Thr Leu
 165 170 175
 Arg Arg Asn Glu Ser His Trp Val Ser Leu Ser Thr Ala Asn Phe Thr
 180 185 190
 Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Gly Ile Asp Asn Pro Gly Ser Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Leu Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Trp Lys Gly Val Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met
 245 250 255
 Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Glu
 260 265 270
 Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Gly Asp Pro
 275 280 285
 Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser Tyr Ala Ile
 290 295 300
 Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys Leu Asn Ser Gly Thr
 325 330 335
 Ser Phe Val Ser Gly Phe Ala Ile Phe Ser Ile Leu Gly Phe Met Ala
 340 345 350

Gln Glu Gln Gly Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly
 355 360 365

Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Lys Ala Val Thr Met Met Pro Leu Pro
 370 375 380

Thr Phe Trp Ser Ile Leu Phe Phe Ile Met Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Gln Phe Val Glu Val Glu Gly Gln Ile Thr Ser Leu Val Asp
 405 410 415

Leu Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu Ile Phe Ile
 420 425 430

Ala Ile Leu Cys Ser Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Thr Met Val Thr
 435 440 445

Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser
 450 455 460

Gly Val Cys Leu Leu Trp Val Ala Phe Phe Glu Cys Phe Val Ile Ala
 465 470 475 480

Trp Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile
 485 490 495

Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Ala Val Ile Thr
 500 505 510

Pro Ala Leu Cys Val Gly Cys Phe Val Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val
 515 520 525

Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Val Tyr Arg Tyr Pro Asp Trp Ala Ile Gly
 530 535 540

Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Ser Ser Met Leu Cys Ile Pro Leu Val
 545 550 555 560

Ile Val Ile Leu Leu Cys Arg Thr Glu Gly Pro Leu Arg Val Arg Ile
 565 570 575

Lys Tyr Leu Ile Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg
 580 585 590

Glu Gly Ala Thr Pro Phe His Ser Arg Val Thr Leu Met Asn Gly Ala
 595 600 605

Leu Met Lys Pro Ser His Val Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615 620

<210> 7
 <211> 1863
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atggccacca aggagaagct gcagtgtctg aaagatttcc acaaggacat cctgaagccc 60
 tcaccaggga agagcccagg cacgcggcct gaggacgagg ctgagggaaa acctccgcag 120
 agggagaagt ggtctagcaa gategacttt gtgctctctg tggctggcgg cttegtgggc 180
 ttgggcaacg tctggegctt cccgtacctc tgctacaaga atggtggagg tgcgtttctc 240
 ataccgtatt ttattttcct gtttgggagc ggctgctg tgtttttctt ggagatcacc 300
 ataggccagt acacctctga agggggcatc acctgctggg aaaagatctg ccccttgttc 360

```

tctggatcgc gctatgcctc cgttgtaatt gtgtccctcc tgaatgtcta ctacatcgtc 420
atcctggcct gggccacata ctacctgttc cagtccttcc agaaggagct gccctgggca 480
cactgcaacc acagctggaa cacacctcac tgcattggagg acaccatgcg caagaacaag 540
agtgtctgga tcaccatcag ctccaccaac ttcacctccc ctgtcatcga gttctgggag 600
cgcaacgtgc tgagcttgtc ccttggaaac gaccaccagc gctctctgaa atgggacctc 660
gctctctgcc ttcttttagt ctggctagtg tgtttcttct gcattctggaa gggcgtcagg 720
tccactggga aggtcgtcta cttcacagcc acttttccat tcgccatgct cctgggtgctg 780
ctggtcggag ggctgacgct gccgggcgcg ggcgcaggca tcaagtteta tctgtatcct 840
gacatcaccg gccttgaggc cccacagggt tggattgacg ctgggactca gatattcttc 900
tcttatgcca tctgectggg ggctatgacc tcgctgggga gctacaacaa gtacaagtat 960
aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgcctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020
ggcttcgcaa ttttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080
gatgtggctg agtcaggctc tggcctggcc ttcattgcct acccaaaagc tgtgacaatg 1140
atgccgctgc ccacattttg gtccattctt ttttttatta tgcttctctt gcttggactg 1200
gatgacaggt ttgttgaagt tgaaggacag atcacacct tggttgatct ttaccatcc 1260
ttcctaagga aggttatcgc tcgggaaatc ttcattgcct tcgtgtgtag catcagctac 1320
ctgctggggc tgacgatggt gacggagggt ggcattgatg tgtttcagct ctttgactac 1380
tatgcagcta gcggtgatg ctttttgtgg gttgcattct ttgaatgttt tgttattgcc 1440
tggatatatg gaggtgataa cttttatgat ggtattgagg acatgattgg ctatcggccc 1500
gggccctgga tgaagtacag ctgggctgtg atcactccag ttctctgtgt tggatgtttc 1560
atcttctcgc tcgtcaagta cgtaccctcg acctacaaca aaacatacgt gtaccccaac 1620
tgggccattg ggctgggctg gagectggcc ctttctcca tgctctgcgt tcccttggct 1680
atcgtcatcc gccttggcca gactgagggg ccgttccttg tgagagtcaa gtacctgtg 1740
acccaaggg aaccaaccg ctgggctgtg gagcgcgagg gagccacacc ttacaactct 1800
cgcaccgtca tgaacggcgc tctcgtgaaa ccgaccaca tcattgtgga gaccatgatg 1860
tga
    
```

<210> 8

<211> 620

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Met Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 1             5             10            15

Ile Leu Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu Asp
             20            25            30

Glu Ala Glu Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser Lys Ile
             35            40            45

Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu Gly Asn Val
 50             55            60

Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu
 65             70            75            80

Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly Leu Pro Val Phe Phe
             85            90            95

Leu Glu Ile Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser Glu Gly Gly Ile Thr Cys
 100            105            110

Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Val
 115            120            125

Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp
 130            135            140

Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe Gln Ser Phe Gln Lys Glu Leu Pro Trp Ala
 145            150            155            160

His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Met
    
```


ES 2 397 383 T3

Pro Val Leu Cys Val Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val
 515 520 525

Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Thr Tyr Val Tyr Pro Asn Trp Ala Ile Gly
 530 535 540

Leu Gly Trp Ser Leu Ala Leu Ser Ser Met Leu Cys Val Pro Leu Val
 545 550 555 560

Ile Val Ile Arg Leu Cys Gln Thr Glu Gly Pro Phe Leu Val Arg Val
 565 570 575

Lys Tyr Leu Leu Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg
 580 585 590

Glu Gly Ala Thr Pro Tyr Asn Ser Arg Thr Val Met Asn Gly Ala Leu
 595 600 605

Val Lys Pro Thr His Ile Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615 620

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un polipéptido, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de taurina y tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado y, de este modo, permite que la célula produzca dicho polipéptido, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de taurina es una célula en la que se ha transferido un ADN que codifica el transportador de taurina y en el que la célula es una célula de mamífero.
5
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula de ovario de hámster chino.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido deseado es un anticuerpo.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que el ADN que codifica el transportador de taurina es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e):
10
 - (a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8;
 - (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 por sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
 - (c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene un 70% o más de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 y que aun así tiene actividad transportadora de taurina;
15
 - (d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7.
 - (e) un ADN que hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 bajo condiciones rigurosas y aun así codifica un polipéptido que tiene actividad transportadora de taurina.
20
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar las células en un medio con una concentración de taurina de 0 a 100 g/l.
6. Un procedimiento de preparación de un producto farmacéutico que contiene un polipéptido deseado, que comprende las etapas de:
25
 - preparar un polipéptido mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y
 - mezclar dicho polipéptido con un transportador farmacéuticamente aceptable.
7. Una célula de mamífero en la que se ha transferido un ADN que codifica un transportador de taurina y aun así tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado.

Fig. 2

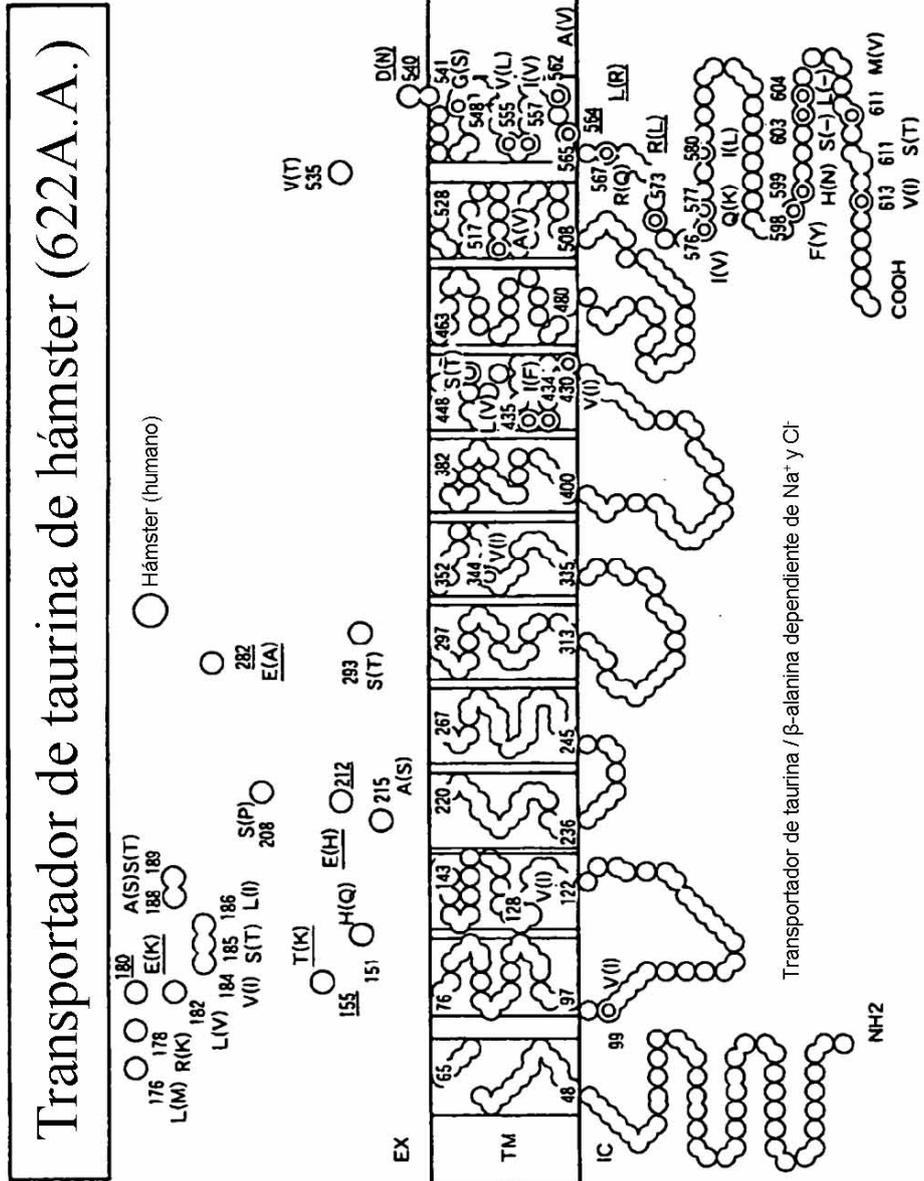


Fig. 3

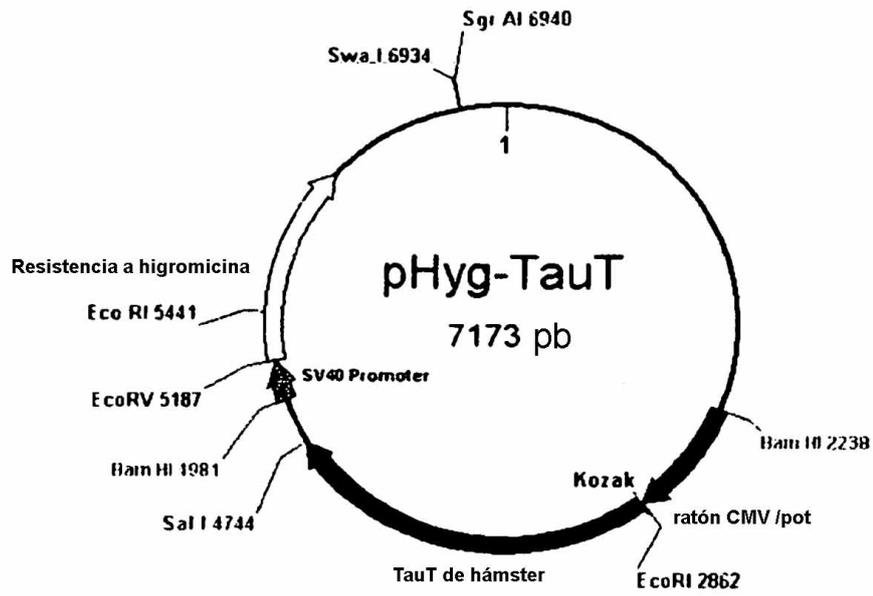


Fig. 4

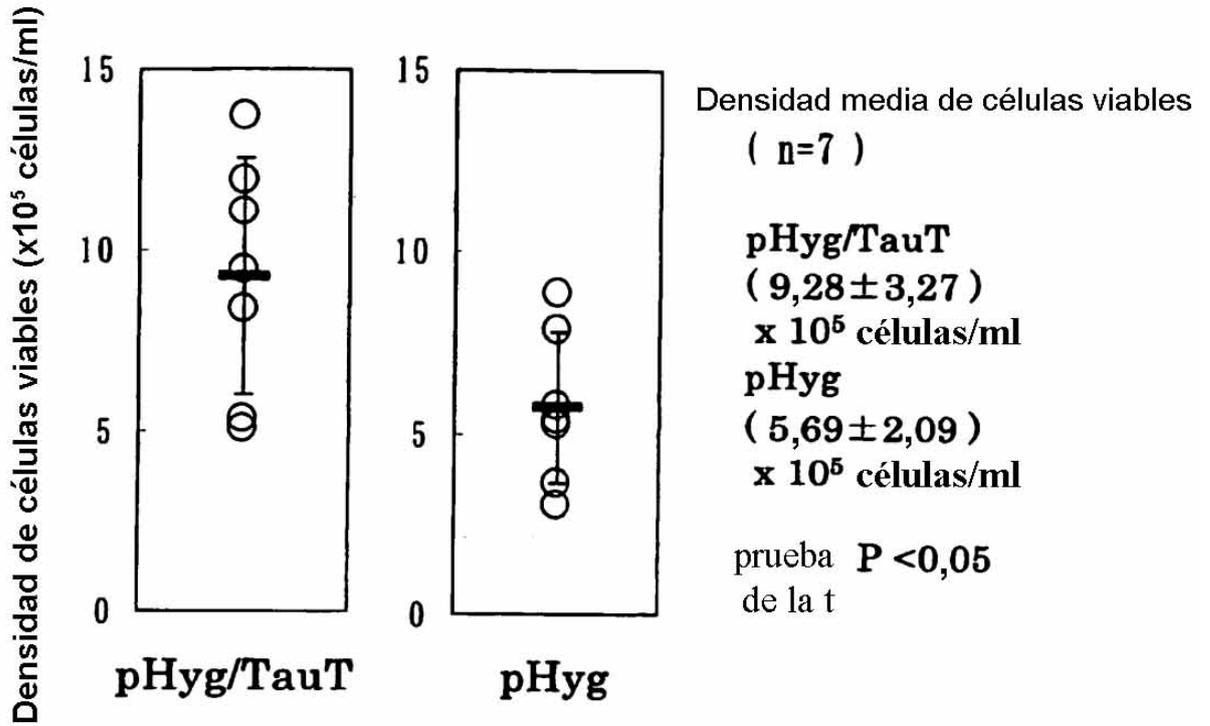


Fig. 5

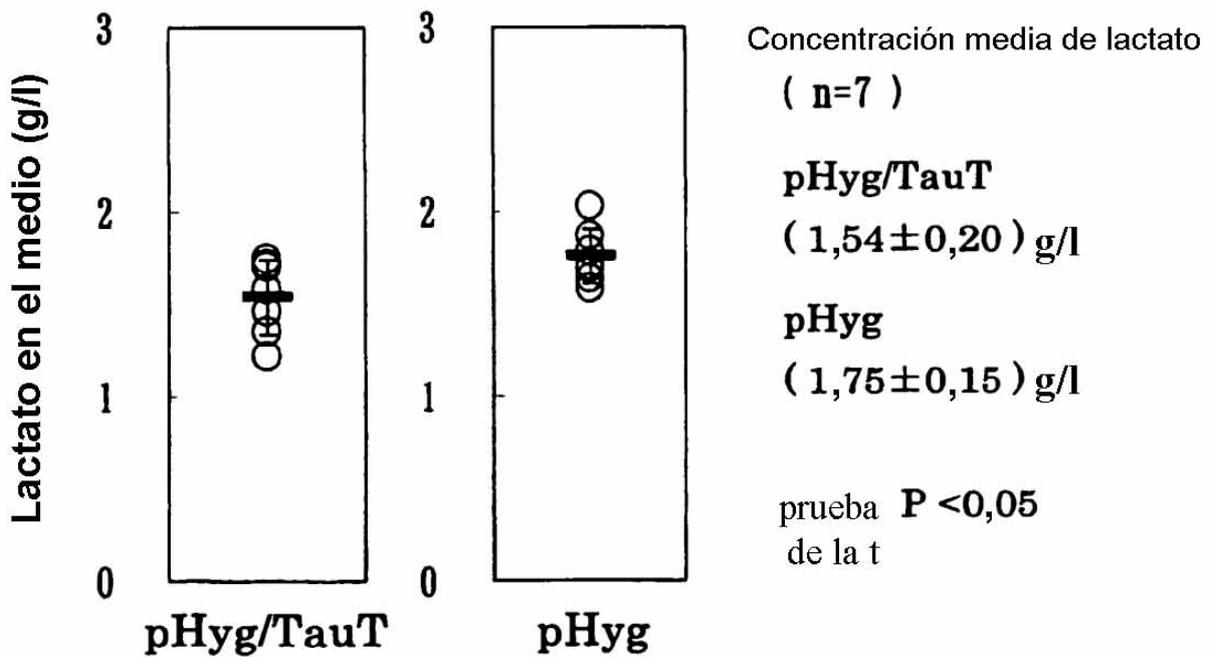


Fig. 6

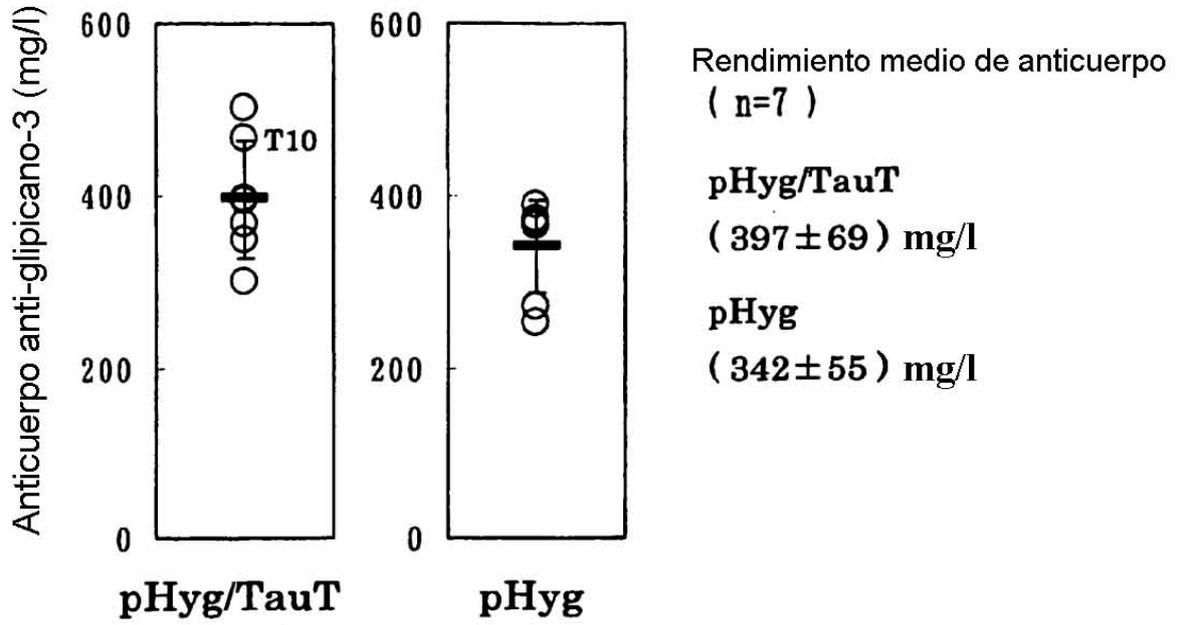


Fig. 7

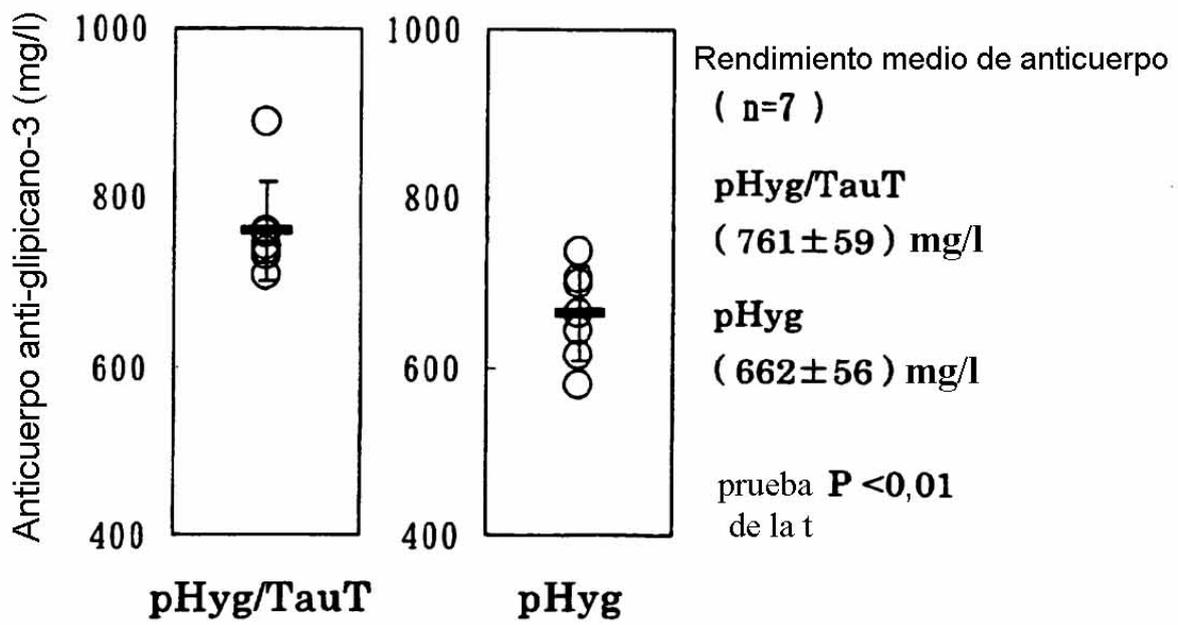


Fig. 8

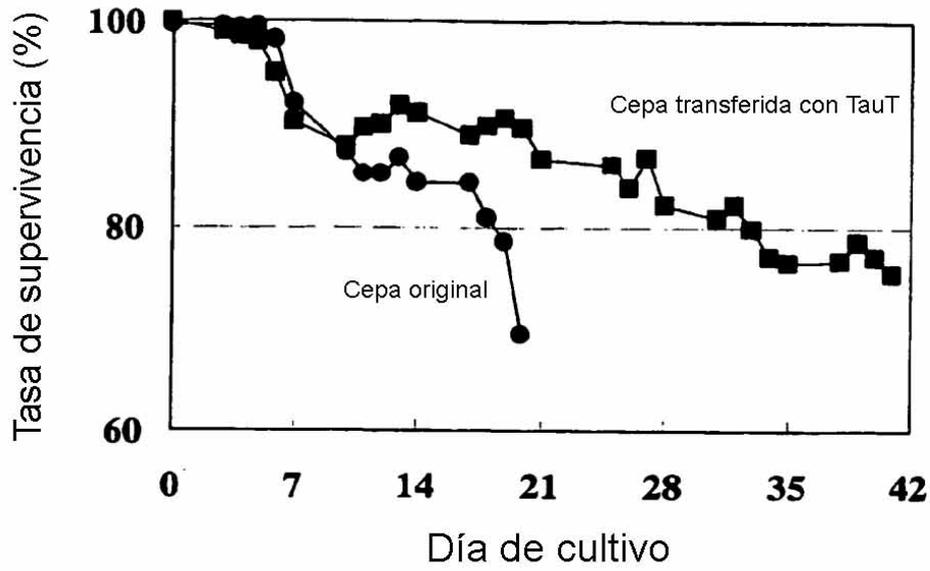


Fig. 9

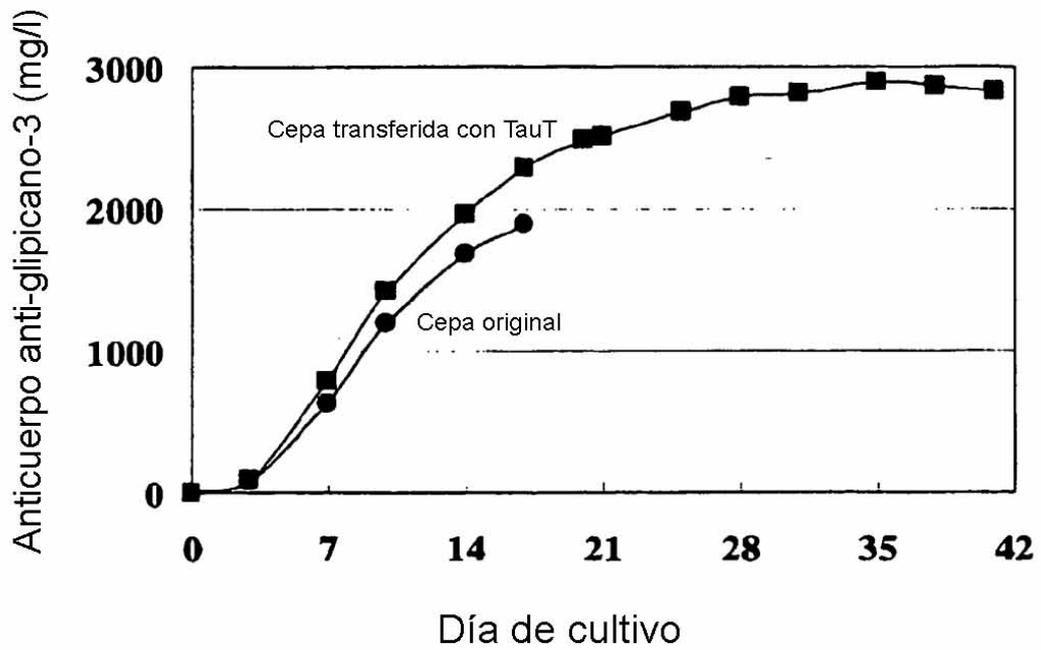


Fig. 10

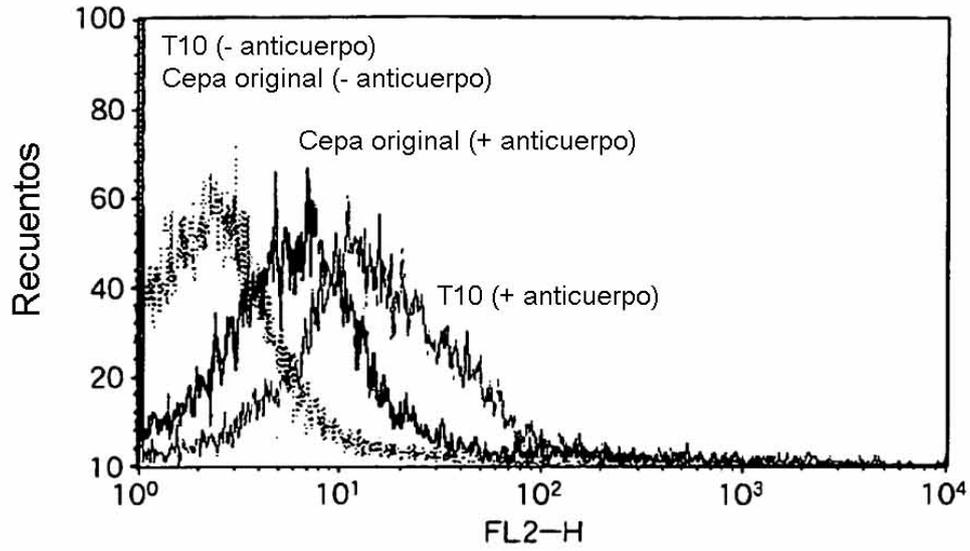


Fig. 11

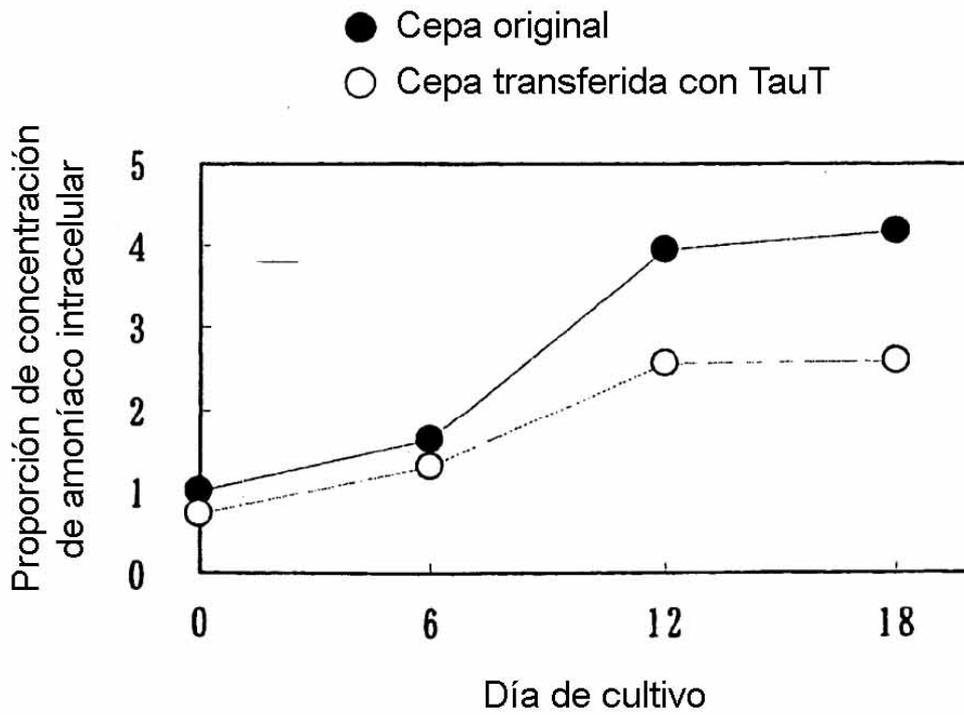


Fig. 12

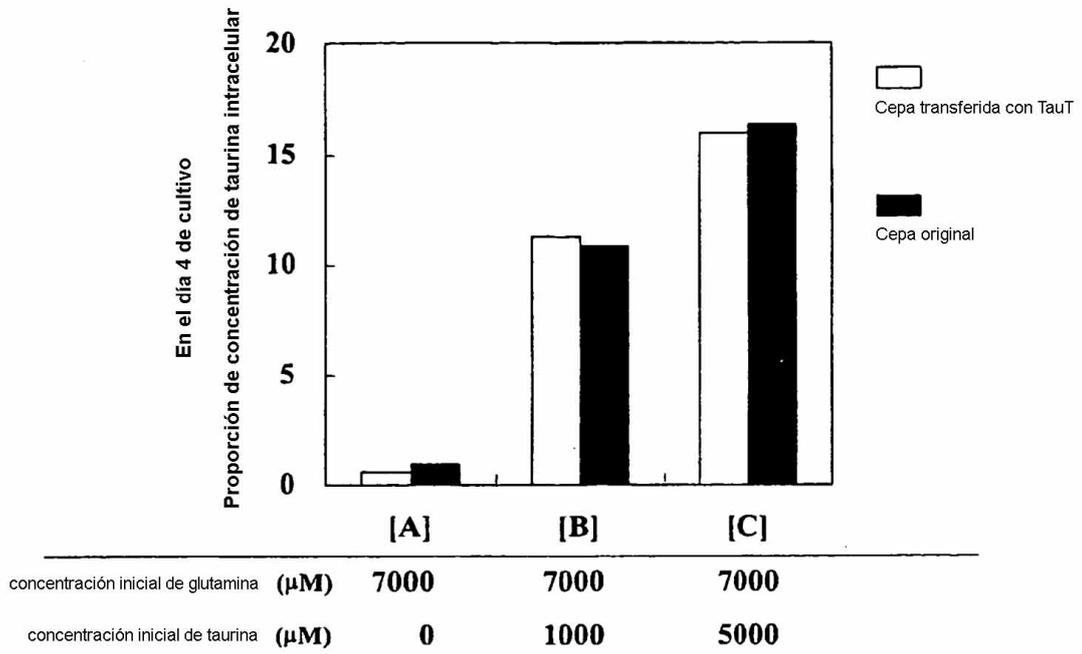


Fig. 13

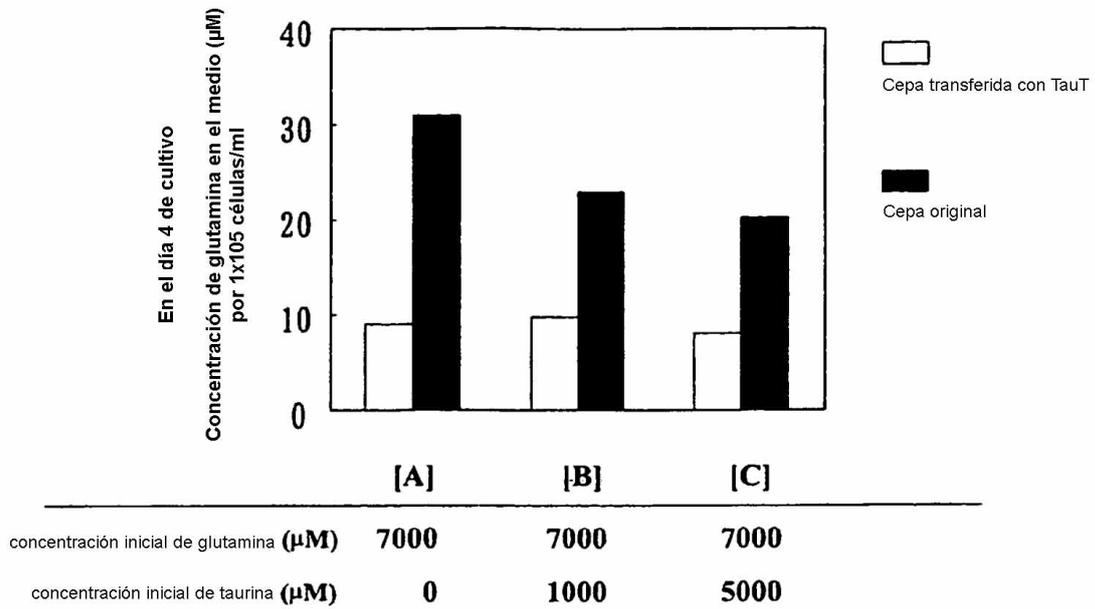


Fig. 14

