

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 931**

51 Int. Cl.:

C12N 15/65

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2002** **E 02702844 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013** **EP 1367126**

54 Título: **Vectores novedosos para células animales y uso de los mismos**

30 Prioridad:

09.03.2001 JP 2001066925

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

22.05.2013

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**MISAWA, ELISA;
YAJIMA, H. y
KONDO, K.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 403 931 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores novedosos para células animales y uso de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir proteínas y similares usando vectores de expresión recombinantes, particularmente a una técnica para seleccionar células, en las que se ha transferido un gen de manera estable, usando un gen resistente a fármaco novedoso como marcador de selección, y a una técnica para obtener eficazmente células en las que un gen se expresa altamente.

Técnica anterior

<Técnicas de producción de proteínas recombinantes>

Se ha vuelto posible producir una variedad de proteínas útiles, incluyendo las que se producen en una cantidad extremadamente pequeña en un organismo o que tienen una estabilidad demasiado baja como para purificarse, mediante la evolución de las técnicas de expresión recombinante de un gen. El uso de tales técnicas ha hecho posible no sólo el uso práctico de muchas proteínas recombinantes como productos farmacéuticos o enzimas industriales, sino también la elucidación de las estereoestructuras de proteínas o el análisis de las interacciones entre proteínas, y por tanto el entendimiento de la vida ha avanzado considerablemente. Además, ha sido posible obtener genes útiles mediante el avance considerable de los estudios del genoma en muchas especies biológicas, incluyendo el ser humano, y el desarrollo de tecnologías de PCR y bioinformática. Por tanto, al contrario que las situaciones convencionales en las que la clonación de genes ha sido con frecuencia el factor determinante de la velocidad de los estudios, ahora se ha requerido una gran cantidad de tiempo para desarrollar la expresión estable de un gen clonado, es decir, el procedimiento para producir una proteína codificada por el gen y en una gran cantidad.

Los huéspedes usados para la producción de proteínas recombinantes incluyen *Escherichia coli*, levadura, células derivadas de insectos y mamíferos, pero aún no se han desarrollado huéspedes universales para producir proteínas que satisfagan todas las necesidades. Por tanto, incluso ahora debe llevarse a cabo un proceso de ensayo y error para la construcción de sistemas de producción para cada proteína pretendida. A modo de ejemplo, aunque *Escherichia coli* es el sistema de expresión usado más popularmente, está en tela de juicio para la producción de proteínas que tienen actividades en las que las proteínas producidas con frecuencia forman cuerpos de inclusión insolubles y la modificación postraducciona tal como glicosilación se produce escasamente al contrario que en eucariotas. Además, también se usan sistemas de expresión en los que se usan eucariotas tales como levaduras u hongos como huéspedes, pero estos sistemas no siempre son eficaces con todas las proteínas y con frecuencia es difícil llevar a cabo la expresión de las actividades o la compleja modificación postraducciona de proteínas derivadas de animales que tienen estructuras complejas. Además, recientemente se ha usado con frecuencia un sistema de expresión con baculovirus y células de insecto como célula huésped. Este sistema tiene muchas ventajas porque la proteína producida se ha sometido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación y glicosilación y por tanto puede expresarse manteniendo las actividades fisiológicas originales, pero la estructura de la cadena de azúcar de la proteína secretada es diferente de la de las células derivadas de mamíferos, de modo que se producirán problemas tales como la antigenicidad de las proteínas recombinantes en aplicaciones farmacéuticas.

Por otro lado, es mejor seleccionar un sistema de expresión con un organismo relacionado con aquél del que se deriva una proteína diana con el fin de producir la proteína en el mismo estado que *in vivo*, es decir, en el mismo estado con respecto a la estereoestructura de la proteína mantenida en un organismo y las modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, glicosilación y truncamiento. Por tanto, se ha usado predominantemente un sistema de expresión que tiene las células derivadas de mamíferos como huésped en la expresión de una proteína que se deriva de animales, en caso de que se requieran las modificaciones postraduccionales tales como glicosilación para mantener la actividad de la proteína, la proteína tenga una estructura complicada o no se hayan identificado las funciones de la proteína. El sistema de expresión con células animales es ventajoso porque la proteína puede someterse a una modificación postraducciona precisa, y por tanto puede esperarse un plegamiento apropiado para ejercer sus actividades. Por tanto, se afirma que es el sistema más apropiado para el fin de análisis bioquímico y análisis funcional de proteínas derivadas de animales.

La expresión se clasifica en dos tipos, el método de expresión transitoria en el que un gen se expresa transitoriamente, y el método de expresión estable en el que se preparan células que expresan constantemente un gen. En el método de expresión transitoria, el gen transferido se transcribe y se traduce en las células, y la expresión de una proteína se observa tras varias horas desde la transferencia y alcanza su máximo tras dos o tres días. Se emplea un método para amplificar el número de copias de un plásmido que contiene ori de SV40 transfiriendo el plásmido en células tales como células COS, en las que se expresa el gen de antígeno T grande de SV40, con el fin de aumentar la cantidad de producción de la proteína, pero requiere la transferencia del plásmido en células cada vez y por tanto la cantidad de la proteína producida mediante este método es limitada. Por otro lado, cuando es necesario realizar el análisis con las células en las que la proteína diana se ha expresado constantemente o producir

la proteína diana en una determinada cantidad, se selecciona el método de expresión estable en el que el gen transferido se inserta en el cromosoma de las células. Si se ha establecido en absoluto una línea celular recombinante que tiene una alta productividad de proteína de interés, todas las células han expresado el gen diana, de modo que puede realizarse una variedad de análisis y también puede llevarse a cabo el cultivo a gran escala con el fin de producir una proteína recombinante homogénea. Sin embargo, dado que la cantidad de expresión génica varía ampliamente entre las líneas celulares recombinantes debido a las copias del gen insertado en el cromosoma de la célula o la posición del cromosoma en la que se ha insertado el gen, debe seleccionarse una línea celular que tiene una alta cantidad de expresión que puede usarse para el análisis o la producción. Sin embargo, la mayoría de los clones de células transformadas tienen cantidades de expresión extremadamente bajas, y por tanto la selección del clon con alta expresión requiere operaciones laboriosas y que requieren mucho tiempo.

Tal como se describió anteriormente, en cualquier caso de producción de una proteína en cualquiera de las formas de expresión, se han tratado diversas ideas para solucionar el problema de que las cantidades de producción de proteínas en células animales siguen estando generalmente a niveles inferiores en comparación con los de otros sistemas de huésped de expresión recombinante.

<Aumento del nivel de expresión de un gen>

El nivel de expresión de un gen eucariota transferido en células animales se regula mediante diversos factores tales como una secuencia de ADN que actúa en cis sobre la expresión del gen o el factor regulador de la transcripción que actúa en trans sobre la secuencia de ADN, el número de copias del gen, el sitio de inserción del gen transferido en el cromosoma y la estabilidad del ARNm (Dillon y Grosveld, Trends Genet., 9:134, 1993). El sistema regulador se ha analizado hasta el momento desde muchos aspectos y se han desarrollado vectores de plásmido para obtener cepas celulares en las que se expresa altamente un gen basándose en estos resultados (Makrides S. C.; 1999). Ahora se describe a continuación información típica.

Los factores que actúan en cis que participan en la regulación de la expresión génica son secuencias de ADN, de las cuales las típicas incluyen secuencia promotora y secuencia potenciadora. Se ha examinado exhaustivamente que una variedad de proteínas reguladoras de la transcripción que regulan la transcripción actúan como factores que actúan en trans en cualquiera de las secuencias. La secuencia promotora está adyacente al sentido 5' del gen y contiene una región esencial para la transcripción básica. La secuencia potenciadora puede estar presente en un lugar alejado del gen o en un intrón, y la orientación de la secuencia no es fija. Además, la secuencia potenciadora puede regular con frecuencia la expresión de un gen específico de tejido. Las actividades de promotores y potenciadores pueden detectarse generalmente, por ejemplo, mediante el experimento de transferencia génica transitoria. Con el fin de expresar altamente un gen foráneo, es importante disponer y usar un potente promotor y una secuencia potenciadora eficazmente. La potente secuencia promotora está con frecuencia en estrecha proximidad con la secuencia potenciadora, e incluye, por ejemplo, promotor temprano de SV40, promotor tardío principal de adenovirus, promotor de metalotioneína I de ratón, repetición terminal larga de virus del sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus (CMV) humano.

Además de los promotores y potenciadores, también hay secuencias reguladoras funcionales en cis para la expresión génica. Estas secuencias se denominan región de control de locus (LCR; Grosveld F., Cell 51:975, 1987), región de unión a matriz (MAR; Phi-Van, Mol Cell Biol 10:2302, 1980), región de unión a andamiaje (SAR; Gasser, Trends Genet 3:16, 1987) o elemento aislante (Kellum, Cell 64:941, 1991), y se cree que actúan sobre la estructura de cromatina del cromosoma. Estas regiones tienen una función similar al potenciador a la vista del hecho de que estas regiones pueden funcionar aunque estén alejadas del gen, pero se distinguen de las secuencias potenciadoras porque estas regiones sólo pueden detectarse mediante el experimento de transferir de manera estable un gen foráneo en el cromosoma. Entre estas secuencias, LCR se distingue de los potenciadores porque funciona dependiendo del sitio y de la orientación con respecto al gen. Además, las secuencias denominadas caja A o caja T y la secuencia de reconocimiento de topoisomerasa II que están característicamente presentes en LCR y SAR son secuencias específicas que no se han encontrado en las secuencias potenciadoras o las secuencias promotoras (Klehr D., Biochemistry 30:1264, 1991).

HIRPE (punto caliente de expresión aumentada de proteína recombinante) es un fragmento de ADN de 5 kb característico que contiene una secuencia similar a MAR y una secuencia enriquecida en AT, y se clona a partir de células CHO en las que se expresa altamente un gen foráneo (Koduri, K., Thammana, P., patente n.º WO 00/17337). Se ha mostrado que la transformación de las células CHO con un plásmido de expresión que contiene el fragmento de ADN ligado a un gen foráneo da como resultado la inserción del plásmido en el sitio particular del cromosoma y el aumento del nivel de expresión en varias veces. Además, el elemento de secuencia que aumenta la expresión (EASE; Morris, A. E., patente n.º WO97/25420) también es un factor descubierto en células CHO y se cree que tiene el efecto de aumentar el nivel de expresión de un gen foráneo insertado de manera estable en el cromosoma en varias veces. La actividad se observa en un fragmento de ADN de 14,5 kb clonado a partir de las células en las que se expresa altamente un gen foráneo. El fragmento de ADN no contiene ningún ORF que codifique para factores reguladores, y por tanto se piensa que el efecto de aumentar la cantidad de expresión del gen se debe a la acción de EASE, tras haberse insertado de manera estable en el cromosoma, sobre una secuencia promotora o una potenciadora. Cualquiera de los métodos es un método de aumento de la expresión génica con un determinado

fragmento de ADN específico, y por tanto estos métodos no pueden aplicarse a la expresión de otros genes foráneos a menos que se usen esos fragmentos de ADN.

También puede establecerse la expresión aumentada de un gen foráneo aumentando el número de copias del gen en células huésped. Uno de los métodos para aumentar el número de copias de un gen foráneo en células transformadas comprende transfectar conjuntamente las células con un plásmido que contiene un gen marcador selectivo y una gran cantidad en exceso de plásmido que contiene un gen foráneo y ningún gen marcador selectivo. Según este método, es posible obtener células transfectadas de manera estable en las que en las que se han insertado varios genes foráneos en el cromosoma (Kaufman, Meth. Enzymol., 185: 537, 1990). Sin embargo, dado que casi todos los clones obtenidos mediante la transfección según este método sólo tienen unas pocas copias del gen foráneo, deben seleccionarse clones en los que se han insertado muchas copias del gen foráneo, y por tanto se requieren operaciones laboriosas y que requieren mucho tiempo.

Otro método para aumentar el número de copias de un gen foráneo comprende la amplificación génica en las células transfectadas de manera estable que se han seleccionado. Se cree que la amplificación génica se produce de manera natural en células animales aunque a una baja frecuencia (Schimke RT, J Biol Chem, 1988, 263, 5989-92). Se ha empleado ampliamente una técnica en la que el gen foráneo se ha transfectado preliminarmente junto con un gen que puede amplificarse en las células huésped aprovechando el hecho de que la amplificación génica se induce exponiendo las células a una presión de selección apropiada, se aumenta continuamente la concentración de un agente de selección, y por tanto se amplifica el gen foráneo junto con el gen marcador.

El gen marcador usado generalmente en esta operación es un gen dhfr que codifica para una enzima dihidrofolato reductasa, y la célula huésped que puede usarse es la célula CHO deficiente para la actividad dhfr. Se amplifica el gen aumentando gradualmente la concentración del inhibidor de dhfr, metotrexato (MTX), y también se espera que el gen foráneo diana en la proximidad del mismo se amplifique a la vez (Mammalian Cell Biotechnology, Ed. Butler, M. IRL Press, P79). Además, se ha descrito que el gen foráneo puede amplificarse hasta el número de copias de 2000 aumentando la concentración de MTX en tres etapas (Bebington, C. y Hentschel, C., Trends Biotechnol., 3., 314 1985). Sin embargo, este método tiene los problemas de que requiere mucho tiempo y sólo puede aplicarse a células deficientes en gen dhfr. Además, el agente para la selección es caro, y por tanto no se prefiere añadir el agente al cultivo a gran escala de células animales recombinantes. Además, también se ha indicado que el gen, una vez amplificado mediante este método, es inestable y tiende a deleccionarse en las condiciones de la ausencia de adición del agente ("Gene", Ver. 6, traducido por Tsuguhiko Kikuchi, págs. 845-848, Tokyo Kagaku Dojin).

<Establecimiento de líneas celulares estables en las que los genes se expresan altamente>

Se requiere un gen marcador selectivo para seleccionar las células animales en las que se ha transferido de manera estable un gen foráneo. Se usan diversas clases de genes marcadores para la selección y se clasifican ampliamente en dos grupos. Uno de los grupos incluye genes de, por ejemplo, hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), timidina cinasa (TK), dihidrofolato reductasa (DHFR) y adenina fosforibosil transferasa (APRT), y sólo pueden usarse como huésped las células deficientes para la actividad enzimática correspondiente a cada uno de los genes. Dado que la auxotrofia en tales células deficientes para esas actividades enzimáticas se recuperará transfiriendo los genes correspondientes, es posible seleccionar las cepas celulares en las que se ha transferido un gen foráneo. Otro grupo es un grupo de genes para conferir resistencia a antibióticos y fármacos que inhiben el crecimiento de las células. Específicamente, incluye, por ejemplo, DHFR mutado para conferir resistencia a metotrexato, xantina-guanina fosforibosil transferasa (gpt) para proporcionar resistencia a xantina, y aminoglicósido 3'-fosfotransferasa derivado de transposón Tn5 (neo) para proporcionar resistencia a fármacos tales como geneticina (G418), gentamicina, kanamicina y neomicina. Recientemente también se han desarrollado los genes para proporcionar resistencia a zeocina o higromicina. Estos genes pueden usarse como genes marcadores selectivos para todas las células animales.

La cicloheximida (CYH) es un inhibidor de síntesis de proteínas, y un ejemplo de aplicación con el gen resistente a CYH como marcador selectivo incluye un ejemplo con levadura. Se ha esclarecido en levaduras que CYH actúa sobre la proteína L41, la subunidad de proteína ribosómica, para inhibir la biosíntesis de la proteína y volverse sensible a CYH cuando el aminoácido en la posición 56 de la proteína es prolina mientras que no es sensible a CYH cuando el aminoácido es glutamina (Kawai S. 1992, J. Bacteriol., 174, 254-262). Basándose en esta información, se ha demostrado que cuando se clona el gen de la proteína L41 a partir de levaduras sensibles a CYH tales como *Candida utilis* y *Phaffia rhodozyma* y se transfiere mutación mediante sustitución para construir un gen del tipo L41-Q, que entonces se transfiere en las levaduras originales, estas levaduras se vuelven resistentes a CYH (Kondo K., 1995, J. Bacteriol., 177, 24, 7171-7177; Kim I.-G., 1998, Appl. Environ. Microbiol., 64, 5, 1947-1949). Sin embargo, no se han descrito aplicaciones para eucariotas superiores tales como células animales.

Los vectores de transferencia de genes foráneos en células animales presentan generalmente o bien uno o bien ambos de estos genes marcadores, y también se usan vectores en los que se ha contenido una proteína verde fluorescente (GFP) con el fin de seleccionar más fácilmente una cepa con alta expresión.

Aunque deben seleccionarse clones en los que la proteína deseada se expresa altamente a partir de muchas células

transfectadas obtenidas con los genes marcadores selectivos descritos anteriormente, un gen foráneo en la mayoría de las células transfectadas se expresa generalmente a un nivel extremadamente bajo y se selecciona con extrema dificultad.

Por tanto, se han descrito varios métodos para seleccionar directamente células transformadas con alta expresión. Uno de los métodos comprende transfectar conjuntamente células con un gen foráneo y un gen dhfr, cultivar directamente las células en un medio de cultivo que contiene Mtx a una alta concentración, y así seleccionar las células transducidas en las que se expresa dhfr a un alto nivel. Muchas de las células seleccionadas mediante este método expresan un gen foráneo a un alto nivel (Page MJ, Sydenham MA, Biotechnology 9, 1991, 64-68). Sin embargo, las células con alta expresión obtenidas directamente mediante una única etapa usando un medio de cultivo que contiene un agente de selección a una alta concentración son inferiores en cuanto al crecimiento y a la estabilidad y por tanto son inapropiadas para el uso para la producción de proteínas durante un largo periodo de tiempo. Además, entre las células recombinantes obtenidas mediante la selección directa con Mtx, puede haber células seleccionadas de manera preferible que contienen enzima dhfr cuya sensibilidad a Mtx se ha cambiado o casi no se ven afectadas por Mtx.

También se ha usado el segundo método que comprende expresar un gen, que codifica para la proteína deseada, junto con un gen marcador selectivo usando un promotor y así obtener eficazmente células con alta expresión. En este método, se usa un vector que se construye para expresar ARNm que consiste en el gen foráneo en el lado 5' y el gen marcador selectivo en el lado 3'. Generalmente se espera que, dado que la eficacia de traducción del gen en el extremo 3' de un ARNm policistrónico es mala, el ARNm policistrónico se expresará a un alto nivel en células transductoras seleccionadas, y la proteína deseada se expresará a un alto nivel (Kaufman RJ, Murtha P, Davies MV EMBO J, 6:187 1987). Sin embargo, cuando la eficacia de traducción del marcador selectivo en el lado 3' se ve ampliamente afectada dependiendo de los genes en el lado 5' o la expresión del gen marcador selectivo en el lado 3' sigue estando a un nivel extremadamente bajo, pueden ocurrir riesgos de que no se seleccione el clon transformado o se seleccione una célula que tiene una eficacia de traducción aumentada del gen marcador selectivo debido a la delección parcial del gen en el lado 5'. El sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) es una secuencia descubierta, por ejemplo, en ARN derivado de virus, y se ha confirmado que fomenta la unión de ribosoma a ARNm y el inicio de la traducción (Kaufman R. J., Nucleic Acid Res 19:4485, 1991). Es posible potenciar la eficacia de la traducción del gen en el lado 3' en el ARNm policistrónico aprovechando esta propiedad, y se han desarrollado con IRES vectores en los que se seleccionan células con alta expresión de manera relativamente fácil.

Como tercer método, también se menciona un método en el que la expresión del gen marcador selectivo se reduce artificialmente para esperar el aumento de la expresión del gen transferido en la célula transfectada al mismo tiempo. Por ejemplo, se dispone un intrón en el lado 5' de un gen en el que se codifica la proteína deseada y se dispone el gen marcador selectivo dentro del intrón. Por tanto, sólo el ARNm con la longitud completa que está presente a una baja frecuencia y no experimentará corte y empalme produce proteínas marcadoras selectivas. Se ha mostrado que el transcrito de un gen que contiene el gen marcador selectivo en el intrón se expresa a un alto nivel en tales cepas transducidas seleccionadas mediante los plásmidos, y por tanto la proteína deseada se expresa a un alto nivel (Clorley, Craig W., documento WO 96/04391). Además, también se ha notificado un método para expresar un gen foráneo a un alto nivel en una cepa transductora seleccionada disminuyendo la expresión de un gen marcador selectivo modificando la secuencia de ADN alrededor del codón de iniciación de la traducción del gen marcador selectivo y reduciendo la eficacia de traducción del gen (Reff Mitchell E. documento WO 98/41645).

Descripción de la invención

Tal como se describió anteriormente, en el sistema de expresión en el que se emplean células animales como huésped, puede esperarse que la proteína expresada realice un plegamiento apropiado para ejercer sus actividades mediante modificaciones postraduccionales precisas, y por tanto el sistema es el más apropiado para examinar las funciones de genes derivados de ser humano y otros animales y para producir una gran cantidad de proteínas codificadas por los genes. Sin embargo, el sistema tiene un grave defecto de baja productividad de proteína en comparación con los sistemas de producción recombinantes con otros huéspedes. Por tanto, es necesario seleccionar clones con alta expresión a partir de muchos clones en los que se ha transfectado de manera estable ADN con el fin de establecer una línea celular con alta expresión. Aunque se haya clonado una célula transfectada de manera estable en la que la proteína deseada se expresa a un nivel comparativamente alto, con frecuencia es necesario realizar una operación laboriosa y que requiere mucho tiempo de amplificación de los genes transfectados con el fin de producir la proteína. A partir de los motivos descritos anteriormente, se desean mejoras adicionales en sistemas de expresión génica con células animales incluyendo el desarrollo de técnicas que permitan la selección eficaz de células animales transformadas en las que un gen se expresa a un alto nivel, el desarrollo de la técnica de estabilización génica en las células obtenidas en las que un gen se expresa altamente y el desarrollo de técnicas de amplificación génica convenientes.

El objeto de la presente invención es solucionar los problemas descritos anteriormente, particularmente proporcionar una técnica para producir proteínas que permite la producción de las proteínas deseadas a un alto nivel.

Los presentes inventores han desarrollado un gen que codifica para una proteína que constituye una subunidad de

ribosoma mutante como gen marcador selectivo novedoso para células animales, y han demostrado que la transducción del gen confiere resistencia a cicloheximida, un inhibidor de síntesis de proteínas, a las células animales. Además, los presentes inventores también han demostrado en células animales resistentes a cicloheximida que se han seleccionado con el vector de expresión que contiene el gen que (i) se obtienen varias células transformadas en las que el gen foráneo se expresa a un nivel extremadamente alto en comparación con células transfectadas de manera estable seleccionadas con los genes resistentes a productos farmacéuticos que se han usado hasta el momento, (ii) las proteínas codificadas por el gen foráneo pueden ser proteínas intracelulares o proteínas secretoras, y no se cambiará la tendencia descrita anteriormente, y (iii) la alta expresión se mantiene de manera estable tras el subcultivo de las células en las condiciones de cultivo en ausencia de cicloheximida. Además, los presentes inventores también han demostrado, a partir del hecho de que no se encuentra correlación entre el número de copias del gen introducido y la expresividad, que la alta expresión de un gen puede provocarse por las frecuencias aumentadas del gen foráneo insertado en el sitio de alta expresión en el cromosoma de las células huésped usando el marcador selectivo.

Tal como se describió anteriormente, los presentes inventores han encontrado el hecho de que puede establecerse una técnica para seleccionar eficazmente, en el plazo de un corto tiempo, las células en las que un gen foráneo se expresa altamente mediante transducción del gen foráneo en forma de un plásmido de expresión con un nuevo gen resistente a fármacos como marcador selectivo en células animales. Basándose en esta información, se ha obtenido la presente invención.

En otras palabras, la presente invención se refiere al contenido tal como se describe en la reivindicación 1.

El gen resistente a cicloheximida que puede conferir la resistencia a cicloheximida a células animales sensibles a cicloheximida codifica para una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1, o la secuencia de aminoácidos tal como se define en el punto (ii) de la reivindicación 1.

También se describe en el presente documento (a modo de referencia) un vector de expresión que contiene el gen descrito anteriormente junto con un gen estructural de proteína foránea, y un método de selección de una cepa de células animales resistente a un inhibidor de síntesis de proteínas en la que se ha transducido el vector de expresión.

Específicamente, un método de selección de una cepa de células animales resistente a un inhibidor de síntesis de proteínas, en el que se transduce el vector de expresión en células animales sensibles al inhibidor de síntesis de proteínas, se cultivan las células y después se selecciona la cepa celular diana usando el gen de resistencia a inhibidor de síntesis de proteínas como marcador de selección. También se describe una célula transformada que comprende las células animales en las que se contiene el vector de expresión, a modo de referencia.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína ribosómica humana L36a (GI 4506651) en comparación con la de la proteína ribosómica de levadura *Candida utilis* L41 (GI1255906).

La sustitución del aminoácido prolina (encerrado en un cuadrado) en la posición 54 en la proteína L36a humana (o en la posición 56 en la proteína L41 de levadura) por glutamina produce proteínas resistentes a cicloheximida, respectivamente.

La figura 2 ilustra el método de construcción del gen resistente a cicloheximida mediante PCR en dos etapas.

En primer lugar, se llevó a cabo la PCR con la combinación de cebadores 1 y 3 y con la combinación de cebadores 4 y 2 con el gen de L36a como molde. Una parte de la secuencia de nucleótidos del cebador 3 y 4 era diferente de la del molde con el fin de sustituir el aminoácido prolina en la posición 54 por glutamina. La PCR llevada a cabo de nuevo con la combinación de cebadores 1 y 2 con la mezcla de los dos productos de PCR así obtenidos como molde dio como resultado la adición del sitio de reconocimiento de enzima de restricción XbaI a ambos extremos terminales, y puede obtenerse un gen de L36a resistente a CYH en el que el aminoácido prolina en la posición 54 se ha sustituido por glutamina.

La figura 3 ilustra la secuencia de ADN del gen de L36a resistente a CYH (gen de L36a-CYH^R) y la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el gen.

La glutamina en la posición 54 en la que se ha introducido la mutación de aminoácido se encerró en un cuadrado.

La figura 4 ilustra la resistencia a cicloheximida conferida por el gen de L36a-CYH^R.

Se transfectó conjuntamente el plásmido pCI-neo-L36 que contiene el gen de L36a-CYH^R junto con el control pSEAP2 que contenía fosfatasa alcalina secretora SEAP en las células CHO, se cambió el medio de cultivo por uno reciente tras 24 horas, y se recogió una parte del sobrenadante tras 4 y 8 horas, respectivamente, para determinar la

actividad de SEAP. Se mostró la actividad tras 8 horas en comparación con la actividad tras 4 horas como 1.

La figura 5 ilustra las estructuras de diversos plásmidos.

5 La figura 6 ilustra el método de análisis de las expresiones de GFP mediante citometría de flujo.

Se representaron gráficamente los números de células en las ordenadas y se representaron gráficamente de manera logarítmica las intensidades de fluorescencia debidas a la expresión de GFP en las abscisas. Se clasificaron las intensidades de fluorescencia en cuatro regiones en el orden creciente de M1 - M4, y las células incluidas en la
10 región M1 se consideraron como el grupo de células en las que no se expresa GFP, mientras que las células incluidas en las regiones M3 y M4 se consideraron como el grupo de células en las que la expresión de GFP es positiva.

15 La figura 7 ilustra las expresiones de GFP de los clones resistentes a CYH y resistentes a G418 aislados.

Se analizaron los 44 clones resistentes a CYH obtenidos mediante transfección de pL36a-neo-GFP y los 46 clones resistentes a G418 obtenidos mediante transfección de pd2EGFP-N1.

20 La figura 8 ilustra las distribuciones de expresiones de fosfatasa alcalina en los clones resistentes a CYH y resistentes a G418 aislados.

Se analizaron los 50 clones resistentes a CYH obtenidos mediante transfección de pL36a-neo-SEAP y los 50 clones resistentes a G418 obtenidos mediante transfección de pNeo-SEAP.

25 La figura 9 ilustra las distribuciones de expresiones de β -galactosidasa en los clones resistentes a CYH y resistentes a G418 aislados.

Se analizaron los 50 clones resistentes a CYH obtenidos mediante transfección de pL36a-neo-lacZ y los 50 clones resistentes a G418 obtenidos mediante transfección de pNeo-lacZ.

30 La figura 10 ilustra las curvas de crecimiento de los clones con expresión de fosfatasa alcalina resistentes a CYH y los clones con expresión de fosfatasa alcalina resistentes a G418.

35 Cada uno de los 15 clones se seleccionó aleatoriamente de los clones resistentes a CYH y los resistentes a G418 en los que se ha transfectado de manera estable el gen de SEAP, respectivamente, y se cultivaron en medios selectivos (que contenían 3 mg/ml de CYH o 1 mg/ml de G418, respectivamente) y en medios no selectivos.

La figura 11 ilustra los tiempos de duplicación promedio de los clones que expresan fosfatasa alcalina resistentes a CYH y los clones con expresión de fosfatasa alcalina resistentes a G418.

40 Se subcultivaron 15 clones seleccionados aleatoriamente de los clones resistentes a CYH y los clones resistentes a G418 en medios selectivos (que contenían 3 mg/ml de CYH o 1 mg/ml de G418, respectivamente) y en medios no selectivos, respectivamente, para calcular el tiempo de duplicación promedio de cada clon en los medios selectivos y los medios no selectivos. Además, también se ilustraron los valores promedio de los tiempos de duplicación.

45 La figura 12 ilustra las estabilidades de las expresiones de fosfatasa alcalina en el clon resistente a CYH y el clon resistente a G418.

50 Se subcultivaron 6 clones seleccionados respectivamente de los clones resistentes a CYH y clones resistentes a G418 en medios selectivos (que contenían 3 mg/ml de CYH o 1 mg/ml de G418, respectivamente) y en medios no selectivos, respectivamente, para medir las expresiones de SEAP y así confirmar la estabilidad de los genes transferidos.

55 La figura 13 ilustra la relación entre las expresiones de fosfatasa alcalina y el número de copias del gen en el clon resistente a CYH y el clon resistente a G418.

Entre los clones transducidos con gen de SEAP, 8 clones del clon resistente a G418 y 12 clones del clon resistente a CYH se sometieron al análisis del número de copias del gen de SEAP mediante PCR cuantitativa.

60 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

En el procedimiento de presente invención, el gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas es un gen resistente a cicloheximida según la reivindicación 1. La presente invención se describe en detalle con referencia a las realizaciones preferidas a continuación.

65

<Gen resistente a cicloheximida>

La cicloheximida (denominada a continuación en el presente documento CYH) es un inhibidor de síntesis de proteínas que actúa en muchas eucariotas y se sabe que muestra efectos inhibitorios suprimiendo la reacción de extensión de una cadena peptídica actuando en la subunidad grande 60S de un ribosoma en el que se lleva a cabo la reacción de traducción de ARNm.

Tal como se describe en el presente documento, la frase “gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas” (normalmente “gen resistente a cicloheximida”) significa un gen que permite conferir la resistencia al inhibidor de síntesis de proteínas (normalmente, CYH) y particularmente permite conferir la resistencia al inhibidor de síntesis de proteínas (normalmente, resistencia a CYH) a animales o células animales sensibles al inhibidor de síntesis de proteínas (normalmente, sensibles a CYH).

El gen resistente a cicloheximida que es el gen usado en la presente invención es el gen de SEQ ID NO: 1 que puede conferir la resistencia a cicloheximida a células animales sensibles a cicloheximida y tiene una secuencia derivada mediante sustitución con un gen que codifica para una proteína que constituye el ribosoma que es el lugar de una síntesis de proteína derivada de animal. La proteína que constituye ribosoma descrita anteriormente (particularmente subunidad grande 60S) derivada de animales es una proteína derivada de ser humano.

El gen resistente a cicloheximida tal como se usa en la presente invención es un gen que codifica para la proteína L36a mutante en la subunidad grande 60S del ribosoma en una célula animal que es resistente a CYH mediante la mutación por sustitución de una proteína L36a o una proteína homóloga funcionalmente equivalente a la misma tal como se define en la reivindicación 1, (ii). Por consiguiente, el gen tal como se usa en la invención es un gen resistente a cicloheximida que puede conferir a células animales sensibles a cicloheximida la resistencia a cicloheximida y que tiene una secuencia mutada mediante sustitución de un gen que codifica para la proteína ribosómica L36a derivada de ser humano o una proteína homóloga a la misma tal como se define en la reivindicación 1, (ii). Tal como se describe en el presente documento, el término proteína homóloga significa las proteínas en las que dos proteínas relacionadas tienen al menos el 90% de homología entre sus secuencias de aminoácidos.

La mutación por sustitución según la presente invención es, tal como se describirá en los siguientes ejemplos, la construcción de un gen resistente a CYH que comprende sustituir el aminoácido prolina en la posición 54 en la proteína codificada por el gen de L36a obtenido de una biblioteca de ADNc humano por glutamina.

En el cuerpo humano está presente un gen de L44 que tiene el 99% de identidad de secuencia con el gen de L36a (que tiene el 99% de identidad en secuencias de aminoácidos correspondientes), que tiene una sustitución del aminoácido en la posición 38 por lisina (véase arginina en L36a). Este gen tiene funciones y secuencia sustancialmente equivalentes a las del gen de L36a y se cree que puede funcionar o usarse como gen resistente a CYH sustituyendo el aminoácido correspondiente prolina en la posición 54 por glutamina. Además, los genes de L44 de ratón o de rata tienen totalmente la misma secuencia que el gen de L44 humano, y el gen de L44 porcino carece de un residuo (en la posición 52 en la secuencia de aminoácidos correspondiente). Se cree que estos genes son los mismos o sustancialmente los mismos que el gen de L44 humano en cuanto a sus funciones y secuencias.

Tal como se describió anteriormente, se cree que dado que todos los genes homólogos de los genes de L36a humanos cuyas secuencias de ADN ya se han confirmado tienen una alta capacidad de conservación de secuencias de aminoácidos, cualquier gen homólogo de los genes de L36a derivados de ser humano (genes que codifican para las proteínas homólogas descritas anteriormente), entre los cuales un aminoácido como determinante de la sensibilidad a CYH, es decir prolina en la posición 54 en la proteína L36a, se ha sometido a una mutación apropiada mediante sustitución por glutamina, puede usarse como gen resistente a CYH con la condición de que los genes resultantes cumplan el requisito de la reivindicación 1, (ii). Además, se predice que cuando las proteínas, incluyendo las derivadas de animales distintos de mamíferos, tienen homologías suficientemente altas de las secuencias de aminoácidos (el 90% o más tal como se describió anteriormente) y un aminoácido como determinante de la sensibilidad a CYH, concretamente en la posición 54 en la proteína L36a, se ha sometido a la mutación apropiada mediante sustitución, es decir, por glutamina, pueden usarse proteínas derivadas de otros animales como gen marcador resistente a CYH de la presente invención para células animales. Esto puede confirmarse llevando a cabo un experimento de transfección en células animales según un procedimiento para seleccionar las cepas de células animales resistentes a cicloheximida de la presente invención o un procedimiento descrito en el presente documento, es decir, un procedimiento para seleccionar cepas de células animales resistentes a cicloheximida que comprende transfectar un vector de expresión que contiene el gen resistente a cicloheximida de la presente invención y un gen de proteína foránea en células animales sensibles a cicloheximida, cultivar las células y seleccionar células con el gen resistente a cicloheximida como marcador selectivo, más particularmente un procedimiento de selección descrito a continuación en el presente documento en el ejemplo 4.

Por otro lado, sigue sin estar claro si el gen de L41 derivado de la levadura *C. utilis*, que ya se ha descrito en las aplicaciones como gen resistente a CYH, puede complementarse funcionalmente debido a la baja homología de la secuencia de aminoácidos con la del gen de L36a humano al nivel del 77%. Además, las proteínas codificadas por el

gen de L41 que también se ha confirmado en *C. elegans* o *C. maltosa* tienen una baja homología con L36a, y por tanto estos genes no se incluyen en los genes para construir el gen resistente a cicloheximida de la presente invención.

Un gen tal como se usa en la presente invención es el gen resistente a cicloheximida que puede conferir la resistencia a cicloheximida a células animales que son sensibles a cicloheximida y codifica para secuencias de aminoácidos codificadas por SEQ ID NO: 1 o secuencias de aminoácidos en las que uno o varios aminoácidos se han sustituido, delecionado, insertado o añadido y que cumplen el requisito de la reivindicación 1, (ii). Con respecto a esto, SEQ ID NO: 1 es la secuencia de la proteína L36a ribosómica derivada de ser humano en la que prolina en la posición 54 se ha mutado mediante sustitución por glutamina. La referencia SEQ ID NO: 2 es la secuencia de la proteína L44 ribosómica derivada de ser humano en la que prolina en la posición 54 se ha mutado mediante sustitución por glutamina.

<Construcción de gen resistente a cicloheximida>

Se ha pretendido una realización típica de la presente invención para proporcionar un gen resistente a CYH como gen marcador novedoso para la transducción basándose en que las células animales son sensibles a CYH. Es decir, se ha examinado si puede construirse un gen resistente a CYH mediante clonación y modificación de un gen de una proteína ribosómica derivada de un animal y puede desarrollarse un sistema de producción de proteína foránea con un vector de expresión construido con el gen marcador. La siguiente descripción ilustra la proteína L36a como una proteína que constituye un ribosoma derivada de un animal. Con el fin de constituir la presente invención, en primer lugar se aísla un gen de la proteína L36a humana y se clona como un gen homólogo a la proteína L41 de levadura. Específicamente, el gen puede clonarse a partir de la biblioteca de ADNc humano usando un oligonucleótido sintetizado a partir de la secuencia de ADN bien conocida como sonda. Aunque el ADNc del gen de L36a se ha clonado con el sistema de selección positiva de ADNc Gene Trapper (Gibco BRL, n.º de cat. 10356-020) en los ejemplos de la presente invención, también es posible realizar la clonación mediante otros métodos, por ejemplo, mediante hibridación con una sonda marcada a partir de una biblioteca de fagos o una biblioteca de plásmidos. Estos métodos pueden llevarse a cabo según la descripción de J. Sambrook, E.F. Frisch, T. Maniatis; Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Con el fin de construir un gen resistente a CYH a partir del gen de L36a clonado, el gen resistente a CYH (gen marcador) que confiere la resistencia a CYH se construyó mediante tres etapas de PCR con un cebador que se designa en los ejemplos de la presente invención para garantizar que el aminoácido correspondiente en la posición 54 del gen de L36a debe convertirse en glutamina y con el gen de L36a como molde (véase la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 en la lista de secuencias). El gen de la presente invención así amplificado mediante PCR puede clonarse con vectores comercialmente disponibles tales como el kit de clonación TA (Invitrogen) y pBluescriptII (Stratagene). Puede emplearse cualquier método apropiado para alterar la secuencia de aminoácidos al tipo resistente, y por ejemplo puede emplearse mutagénesis dirigida al sitio con un cebador con apareamiento erróneo. Este método se ha descrito en detalle en la bibliografía descrita anteriormente, Molecular Cloning, 2ª edición. Además, el gen de la presente invención también puede prepararse mediante la síntesis química de un ácido nucleico según los métodos habituales tales como el método de triéster de fosfito (Hunkapiller, M. *et al.*, Nature, 310, 105, 1984) basándose en las informaciones de secuencia de polinucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 ó 2. Además, es posible construir el gen resistente a CYH introduciendo una mutación de aminoácido en el gen de L36a disponible de bases de datos de ADN públicas, usando PCR, mutagénesis dirigida al sitio, método de síntesis química y similares, basándose en las informaciones de secuencia de genes conocidos funcionalmente homólogos de modo que el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 54 del gen de L36a debe ser glutamina. La secuencia de bases del ADN así obtenido puede confirmarse mediante análisis por ejemplo según el método de Maxam-Gilbert (Maxam, A. M. y Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 560, 1977) y el método de Sanger (por ejemplo, Sanger, F. & A.R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975; Sanger, F. & Nicklen y A.R. Coulson., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977).

<Construcción de un vector que contiene un gen marcador selectivo>

La presente invención también se refiere al procedimiento según la reivindicación 1 con un vector recombinante que contiene el gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas descrito anteriormente (gen resistente a CYH) y a un vector de expresión que contiene el gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas y un gen de proteína foránea.

Con respecto a la expresión del gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas en células huésped tal como se usa en la presente invención, el gen de la presente invención puede expresarse en células huésped usando un vector en el que se inserta el gen operativamente unido a una secuencia reguladora tal como una secuencia promotora y una secuencia terminadora. Tal como se describe en el presente documento, la frase operativamente unido significa que en un huésped en el que el gen según la presente invención, la secuencia reguladora está unida al gen tal como se usa en la presente invención para garantizar que el gen se expresa bajo el control de la secuencia reguladora. Generalmente es posible unir el promotor en el sentido 5' del gen y el terminador en el sentido 3' del gen.

El promotor usado no se limita específicamente y puede ser el que muestra actividades promotoras en células huésped que van a transformarse. La región promotora en un cromosoma en el que se expresa originalmente el gen de L36a puede usarse para la expresión, y en la presente invención en la que el huésped para la transformación son las células animales, pueden emplearse otros promotores incluyendo un promotor temprano o tardío de adenovirus (Ad), un promotor temprano o tardío de virus del simio 40 (SV40), un promotor de gen de timidina cinasa (tk) de virus del herpes simple (VHS), promotores obtenidos de genomas virales de virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, virus de papiloma de ratón, virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, retrovirus, virus de la hepatitis B y similares, promotores derivados de mamíferos tales como un promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y promotor de proteína de choque térmico.

El vector de ADN recombinante según la presente invención no se limita específicamente y puede ser aquél en el que se ha transducido el gen resistente a CYH en una forma que va a expresarse en células huésped. Por ejemplo, puede construirse un vector tal como pCI-neo (Promega) ligando el gen resistente a CYH de una forma operativa a un vector (normalmente un plásmido) en el que se han contenido previamente secuencias promotora y terminadora que funcionan en células animales. También es posible construir el vector recombinante según la presente invención ligando el gen resistente a CYH que se ha vuelto operativo, por ejemplo, con un promotor de gen temprano de CMV y un terminador de gen tardío de SV40 y un vector de plásmido pUC18 (Takara Shuzo Co., Ltd.) que contiene un gen resistente a ampicilina y origen de replicación de *Escherichia coli* (ColE1 ori), o un plásmido tal como pBluescriptII (Stratagene) y pBR322. Además, si es necesario, el vector recombinante según la presente invención puede usarse en combinación con otros genes marcadores selectivos tales como el gen resistente a G418 o con un gen que permite la amplificación génica tal como un gen dhfr. Será posible amplificar eficazmente el gen de un plásmido que contiene un gen de proteína foránea (vector de expresión) y el gen dhfr con metotrexato tras transferir el gen marcador selectivo y el plásmido en una célula huésped usando células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa como células animales huésped para la transformación. Es decir, se ha mostrado que también se amplifica la secuencia de gen foráneo físicamente unida a la secuencia de gen dhfr (Kaufman RJ, Sharp PA, J. Mol. Biol., 25:601, 1982, Christman JK, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:1815, 1982). Además, los vectores de expresión pueden ligarse a una secuencia señal, si se desea, para recoger el producto de expresión del gen foráneo diana con facilidad.

Además, también es posible transducir un gen indicador, con el cual puede medirse fácilmente la actividad, al vector recombinante según la presente invención para garantizar que puede seleccionarse fácilmente un clon en el cual el gen foráneo se expresa altamente. Como gen indicador puede usarse, por ejemplo, un gen de GFP que codifica para una proteína verde fluorescente. Un clon que expresa altamente el gen de GFP puede concentrarse convenientemente, por ejemplo, mediante citometría de flujo tal como se describe en el ejemplo 5.

En cuanto a los métodos generales para construir el vector recombinante y los vectores de expresión, es posible hacer referencia a bibliografías tales como Molecular Cloning 2ª edición, que se incorporará en los ejemplos a continuación.

<Gen foráneo que puede transducirse por el gen marcador selectivo>

Es posible expresar un gen foráneo, a un alto nivel, que codifica para el polipéptido deseado en células huésped con el vector de expresión según la presente invención. Tales polipéptidos incluyen los siguientes.

Los polipéptidos típicos incluyen diversos anticuerpos monoclonales, citocinas (por ejemplo, interferón (IFN) α , β , γ , factor de necrosis tumoral (TNF), linfotoxina (LT), interleucina (IL) 1-13, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de células madre (SCF), factor de inhibición de leucemia (LIF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de endotelial vascular (VEGF), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factores de crecimiento transformantes tales como TGF α y TGF β , similares), proteínas de antígeno de virus (por ejemplo, proteínas de antígeno de virus de inmunodeficiencia humano (VIH), virus de la hepatitis B humano (VHB), virus de la hepatitis C humano (VHC), virus del herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), virus de leucemia de células T adultas (ATLV), virus influenza, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubeola, virus del sarampión, y similares), diversos receptores (por ejemplo, receptor acoplado a proteína G (GPCR), receptor de citocinas, receptor nuclear, y similares), diversas proteínas reguladoras de la expresión génica, superóxido dismutasa, α -1-antitripsina, insulina, proinsulina, hormona estimulante de vesículas, calcitonina, hormona leuteinizante, glucagón, factores de coagulación de la sangre tales como factor VIIIc, factor IX, factor Xa, factor tisular y factor de Willebrand, factores anticoagulantes tales como proteína C, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, activadores del plasminógeno tales como urocinasa y activadores del plasminógeno tisular o urinario humano (t-PA), bombesina, trombina, encefalinasa, proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1- α), albúminas séricas tales como albúmina sérica humana, péptidos relacionados con gonadotropina de ratón, inhibina, activina, y similares.

En la presente invención, los vectores de expresión, que comprenden el gen resistente a CYH y el gen de proteína foránea en la forma que va a expresarse, no se limitan específicamente.

<Células huésped que pueden transformarse con el gen marcador selectivo de la presente invención>

Células huésped en las que puede llevarse a cabo la transducción con el gen marcador selectivo, es decir el gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas según la presente invención (gen resistente a cicloheximida) son células sensibles a inhibidor de síntesis de proteínas (células sensibles a cicloheximida) derivadas de cualquier animal, particularmente mamíferos. Por ejemplo, los ejemplos de células huésped de mamífero útiles incluyen líneas derivadas de riñón de simio transformadas con SV40 (células COS7), líneas renales embrionarias humanas (células 293), células de riñón de cría de hámster (células BHK), células de ovario de hámster chino (células CHO, particularmente células CHO (DHFR⁻) (ATCC, CRL-9096)), células de Sertoli de ratón (células TM4), células renales de simio (células CV1), células renales de mono verde africano (VERO células), células de carcinoma de cuello uterino humanas (células HeLa), células renales caninas (células MDCK), células de hígado de rata de Buffalo (células BRL3A), células pulmonares humanas (células W138), células de hígado humanas (células HepG2), células TRI, células MRC5, células FS4, y similares. Además, también es posible usar células de mieloma usadas como células para fusión celular, células de hibridoma usadas fusionando estas células con una variedad de linfocitos o células del bazo.

Entre estas células animales, se prefieren las células CHO derivadas de ovario de hámster chino, y se prefieren más las células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (células DHFR⁻).

Además, las células animales son generalmente sensibles a inhibidores de síntesis de proteínas, y esto puede confirmarse fácilmente cultivando las células en un medio que contiene el inhibidor.

Las diversas células animales descritas anteriormente pueden estar fácilmente disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y otras organizaciones de conservación, y también están comercialmente disponibles del Instituto de Investigaciones Físicas y Químicas, Banco de Células Vegetales, y similares.

<Transformación de células animales y selección de los clones resistentes a CYH>

La presente invención también se refiere a las células animales transformadas que contienen los vectores de expresión descritos anteriormente según la presente invención, y un procedimiento para seleccionar una cepa de células animales resistente a inhibidor de síntesis de proteínas que comprende cultivar las células animales transformadas y seleccionar una cepa celular con un gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas (normalmente, gen resistente a cicloheximida) como marcador selectivo.

Como métodos para transfectar los vectores de expresión según la presente invención, en una realización típica, que contienen el gen resistente a CYH en células animales, puede usarse el método de precipitación de fosfato de calcio (Graham, van der Eb, *Virology*, 52:456, 1973) así como otros métodos bien conocidos tales como el método de microinyección (Capecchi, MR, *Cell*, 22:479, 1980), el método de electroporación (Zimmermann, U., *Biochim. Biophys. Acta*, 694: 227, 1982), el método de liposoma (Mannino, R.J., Gould-Fogerite, S., *BioTechniques*, 6:682, 1988), y similares. En cualquier caso de experimentos de transfección, pueden clonarse células transfectadas cambiando el medio por el que contiene CYH generalmente 1-3 días tras haberse transfectado el ADN de plásmido en células animales. A modo de ejemplo, cuando se lleva a cabo la transfección mediante el método de liposoma con las células CHO como células huésped, el procedimiento se realiza generalmente de la siguiente manera. En primer lugar, se mezclan 1 µg de un plásmido y 6 µl de reactivo Lipofectamine (Gibco BRL, 18324-012) y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añaden a 5x10⁵ células CHO. Se cambia el medio tras 16 horas para cultivar la mezcla durante 24 horas adicionales y después se recogen las células. Se diluyen las células recogidas, se siembran de nuevo en una placa que tiene un diámetro de 10 cm y se cultivan durante 24 horas, tras lo cual se cambia el medio por el que contiene CYH en una concentración de 3 µg/ml-10 µg/ml con el fin de cultivar la mezcla durante 2-3 semanas adicionales y así pueden seleccionarse clones transducidos resistentes a CYH.

El siguiente método puede usarse con el fin de separar rápidamente los clones resistentes a CYH de células no transformadas. Es decir, se diluyen las células recogidas tras la transfección y se siembran, por ejemplo, en una placa de 24 pocillos para su cultivo. Tras cultivarse las células en un medio que tiene CYH añadido al mismo durante aproximadamente 1 semana, se recuperan las células una vez mediante tratamiento con tripsina y se siembran de nuevo, por ejemplo, en una placa de 24 pocillos para su cultivo durante 1 semana adicional. Mediante esta etapa de recuperación y nueva siembra adicional será posible eliminar las células no transformadas fijadas sobre la superficie de la placa y recuperar sólo las células transformadas, y por tanto puede acortarse el tiempo de aislamiento de la célula que expresa el gen estable.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir una proteína que comprende cultivar las células transformadas anteriormente descritas de la presente invención, recoger una proteína foránea expresada del cultivo.

Pueden cultivarse células animales transformadas mediante métodos bien conocidos, y por tanto puede hacerse referencia a Molecular Cloning, Current Protocols y similares descritos a continuación en el presente documento en

los ejemplos. Como medio pueden usarse, por ejemplo, medios MEM, DMEM y RPMI1640 que contienen aproximadamente el 5-20% de suero bovino fetal. El valor de pH está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6-8. El cultivo puede llevarse a cabo generalmente a aproximadamente 30-40°C en presencia del 5% de CO₂ durante aproximadamente 15-60 horas, y continuarse cambiando el medio cada varios días. Cuando las células han crecido hasta un nivel confluyente, se dispersan las células en individuales generalmente con una disolución en PBS de tripsina a aproximadamente el 0,25%, se diluyen varias veces y se siembran en un nuevo recipiente de cultivo para su cultivo adicional. Cuando las células han crecido hasta la cantidad objetivo, se recogen estas células. Por tanto, puede realizarse un subcultivo para expandir una escala de cultivo a una opcional.

La expresión del gen transferido puede comprobarse mediante métodos tales como por ejemplo el ensayo de transferencia tipo Northern o RT-PCR con ARN recuperado de las células, el ensayo ELISA o ensayo de inmunotransferencia tipo Western con un anticuerpo de la proteína expresada, o la detección de actividad enzimática en el medio de cultivo o células en el caso de que la proteína sea una enzima. Cuando el gen foráneo que va a expresarse es GFP, el nivel de expresión puede medirse analizando las células recuperadas mediante citometría de flujo. Dado que se observa una correlación muy alta entre la cantidad de expresión de GFP y la intensidad de fluorescencia obtenida mediante análisis de FACS, puede pensarse en la intensidad de fluorescencia como la expresión de GFP. Cuando el gen foráneo que va a expresarse es un gen de fosfatasa alcalina y un gen de β -galactosidasa, es posible examinar la cantidad de expresión midiendo las actividades enzimáticas respectivas.

Aunque la proteína foránea deseada se recupera de un cultivo (que contiene un medio y células), preferiblemente del medio como polipéptido secretor, también puede recuperarse de un lisado de células huésped cuando se ha expresado directamente sin ninguna secuencia señal secretora. Cuando la proteína deseada se ha expresado en células recombinantes no derivadas de ser humano, el producto diana no contiene otras proteínas o polipéptidos derivados de ser humano. Sin embargo, es preferible purificar el producto diana de otra proteína o polipéptido derivado de las células recombinantes y así obtener un producto sustancialmente uniforme con respecto al producto de expresión diana. Como primera fase para lo mismo, se centrifuga un medio habitual (que contiene células) o un lisado celular para eliminar células o residuos celulares. A continuación, se purifica el producto diana mediante aislamiento y purificación de una proteína de las otras proteínas y polipéptidos contaminados, por ejemplo, fraccionando con columnas de inmunoadfinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía con resinas de intercambio catiónico tales como sílice o DEAE, por ejemplo electroforesis en gel con Sephadex G-75; o cromatografía con una columna de plasminógeno a la que se une el producto diana con el fin de eliminar contaminantes tales como IgG y similares, y con una columna de proteína A-Sepharose. Puede hacerse referencia a estos métodos, por ejemplo, en *Guide to Protein Purification Methods in Enzymology*, vol. 182, editado por Deutscher, Academic Press, y otros.

Es posible, según la presente invención, seleccionar eficazmente un clon celular resistente a cicloheximida y obtener el producto de expresión del gen foráneo deseado expresado altamente como un producto purificado.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, pero el alcance de la presente invención no se limita a los mismos.

Se ha llevado a cabo una variedad de técnicas experimentales referentes a la recombinación de genes, tales como clonación, descritas a continuación en el presente documento según los métodos de ingeniería genética descritos en la bibliografía de J. Sambrook, E.F. Frisch, T. Maniatis; *Molecular Cloning* 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y Frederick M. Ausubel *et al.*, Ed., *Current Protocols*, *Current Protocols in Molecular Biology*.

Ejemplo 1: Clonación de gen de L36a humano

Se ha confirmado buscando en bases de datos de ADN públicas que un gen humano homólogo al gen de L41 de levadura es el gen de L36a (GI 4506651). La homología de las secuencias de aminoácidos de L41 *Candida utilis* y L36a se ilustra en la figura 1. Se sintetizó químicamente un oligonucleótido HL36G1 (5'-AGA AGT GTG GCA AGC ATC AG-3', SEQ ID NO: 3) y se usó como sonda. Se clonó el ADNc del gen de L36a a partir de la biblioteca de ADNc (Superscript Human Fetal Brain cDNA Library, Life Technologies, n.º de cat. 10662-013) derivada de cerebro embrionario humano con un sistema de selección positiva de ADNc Gene Trapper (Gibco BRL, n.º de cat. 10356-020). Se realizó la clonación según el manual adjunto. Específicamente, se desnaturalizó la biblioteca de ADN bicatenario en la que se ha insertado ADNc en el sitio NotI-Sall de un vector pCMV-SPORT para la expresión de células animales, para ser la estructura monocatenaria, y se formó un híbrido con HL36G1 que tenía un marcador de biotina. Se adsorbió el híbrido así formado en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina para concentrar el clon de ADNc de L36a. Tras la concentración, se convirtió el ADN de nuevo en el ADN bicatenario con HL36G1 no marcado como cebador con el fin de transformar *Escherichia coli* Ultramax incluidas en un kit. Entre los transformantes así obtenidos se extrajeron ADN de plásmido de 40 clones mediante el método habitual para seleccionar clones en los que estaba contenido L36a. La selección se realizó mediante PCR. Se llevó a cabo PCR con polimerasa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) en las condiciones de PCR ((30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C) x 25 ciclos). Los cebadores usados fueron HL36G1 como cebador directo, y 5'-CTC CTC CCA

GTT CAA AAT GC-3' (HL36RT1, SEQ ID NO: 4) como cebador inverso. Como resultado, se ha confirmado que el gen de L36a está contenido en 14 clones de entre 40 clones. Se escindió un fragmento de ADNc de estos plásmidos con enzimas de restricción NotI y Sall y se comprobó la longitud de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Además, se comprobaron las secuencias de 6 clones que tenían un fragmento de ADN de inserto largo de entre estos clones y se aclaró que cada clon contenía la longitud completa del ORF que comprendía 318 bases del gen de L36a.

Ejemplo 2: Construcción de gen resistente a cicloheximida y confirmación de su función

Con el fin de conferir la resistencia a CYH al gen de L36a humano, se introdujo la mutación en la que el aminoácido prolina en la posición 54 se sustituyó por glutamina. Específicamente, con el fin de convertir la base C en la posición 167 de ORF en A, se realizaron 3 etapas de PCR con cuatro cebadores químicamente sintetizados tal como se ilustra en la figura 2. Específicamente, en primer lugar se realizó PCR con una combinación del cebador directo 1 (5'-GGG TCT AGA ATG GTC AAC GTA CCT AAA AC-3', SEQ ID NO: 5) y el cebador inverso 3 (5'-CCG GAA AAT TTG CTT TGT CTG CCC A-3', SEQ ID NO: 6) y una combinación del cebador directo 4 (5'-GGG CAG ACA AAG CAA ATT TTC CGG-3', SEQ ID NO: 7) y el cebador inverso 2 (5'-GGG TCT AGA TTA GAA CTG GAT CAC TTG GC-3', SEQ ID NO: 8) en presencia del gen de L36a como molde. Se llevó a cabo PCR con polimerasa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) en las condiciones de PCR ((30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C) x 25 ciclos). Tras purificar los dos productos de PCR así obtenidos con el kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche, 1-732-668), se realizó la PCR ((30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C) x 25 ciclos) con el cebador directo 1 y el cebador inverso 2 en presencia de la mezcla como molde para dar el gen de L36a resistente a CYH (L36a-CYH^R) al que se le habían añadido los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en ambos extremos terminales (SEQ ID NO: 1 y 3). Se digirió el fragmento de ADN de aproximadamente 0,3 kb así amplificado con XbaI y después se clonó en el sitio XbaI de pUC18. Se usó el kit de secuenciación con ciclos de terminador colorante (Perkin-Elmer) para determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado y tras confirmar secuencia de nucleótidos del gen obtenido, se insertó el fragmento de XbaI que contenía el fragmento de L36a-CYH^R en el sitio XbaI en el sentido 3' de la región promotora del gen temprana de CMV de la célula animal que expresaba el vector pCI-neo (Promega, n.º de cat. E1841) para dar un plásmido pCI-neo-L36.

Con el fin de comprobar si el gen de L36a-CYH^R construido confiere la resistencia a cicloheximida a células animales, se realizó un experimento de transfección en células CHO (DHFR) derivadas de hámster chino (ATCC, CRL-9096, denominadas a continuación en el presente documento "células CHO"). Específicamente, se transfectó conjuntamente 1 µg del plásmido pCI-neo-L36 o pCI-neo junto con 0,1 µg de plásmido de control pSEAP2 (Clontech, 6052-1) que contenía fosfatasa alcalina secretora SEAP en las células CHO. Se realizó el experimento de transfección según el método descrito en el ejemplo 4 y se transfectaron los plásmidos en 1x10⁵ células CHO cultivadas en una placa de 24 pocillos durante la noche. Tras cultivar durante 24 horas, se lavaron las células dos veces con el medio y se cambió el medio por los que contenían CYH en la concentración de 0 y 10 mg/ml, respectivamente. Tras 4 y 8 horas, se recuperó una parte del sobrenadante y se midió la actividad de SEAP. La actividad tras 8 horas basándose en la actividad tras 4 horas como 1 fue de 2,17 (CYH, 0 mg/ml), 1,44 (CYH, 10 mg/ml) en pCI-neo-L36, y de 2,15 (CYH, 0 mg/ml), 1,09 (CYH, 10 mg/ml) en pCI-neo (figura 4). Se ha confirmado a partir del resultado que pCI-neo-L36 confiere la resistencia a CYH a las células CHO, las células en las que se ha transferido el plásmido viven incluso en presencia de CYH, y el gen indicador en los plásmidos transfectados conjuntamente se expresa.

Ejemplo 3: Construcción de plásmido de expresión

Se transfirieron respectivamente tres genes indicadores en el sitio BamHI de pCI-neo-L36 en un sentido opuesto al gen neo para construir los vectores de expresión que contenían L36a-CYH^R. Como gen indicador, se usaron un gen de proteína verde fluorescente que tenía una semivida corta d2EGFP (derivado de pd2EGFP-N1, Clontech, 6009-1) y uno de β-galactosidasa (b-galactosidasa; lacZ) (derivado de pCH110, Pharmacia, 27-4508-01), ambos de los cuales son indicadores acumulados intracelularmente y una fosfatasa alcalina secretada extracelularmente SEAP (derivado de control de pSEAP2, Clontech, 6052-1).

Las estructuras de los vectores de expresión en los que se han transferido cada uno de los tres genes indicadores se ilustran en la figura 5 y se denominan pL36a-neo-GFP, pL36a-neo-lacZ, pL36a-neo-SEAP, respectivamente. También se construyeron como experimentos de control los vectores pNeo-SEAP y pNeo-lacZ que tienen la misma estructura que pL36a-neo-lacZ y pL36a-neo-SEAP, respectivamente, excepto porque no se contiene L36a-CYH^R.

Estos plásmidos se construyeron tal como sigue. Se digirió el plásmido pd2EGFP-N1 con BglII y BamHI antes de la auto-ligación para eliminar el sitio de clonación múltiple entre el promotor y el gen de d2EGFP. Posteriormente, se digirió el plásmido con PshBI y AflII para escindir el fragmento de ADN de 1,7 kb que contenía promotor de gen temprano de CMV + gen de d2EGFP + señal de poliA derivada de SV40. Se hicieron romos los extremos terminales de fragmento de ADN con fragmento de Klenow, extremo al cual se ligó el ligador de BamHI (5'-CCCGGATCCGGG-3', Takara Shuzo Co., Ltd., 4810P) antes de la digestión adicional con BamHI, y se insertó en el sitio BamHI de pCI-neo-L36 para construir pL36a-neo-GFP. Se digirió el plásmido pCH110 con NcoI y se hicieron los extremos romos con fragmento de Klenow antes de la adición del ligador de BamHI. Se escindió un fragmento de ADN de 3,9 kb que

contenía promotor de gen temprano de SV40 + gen lacZ + señal de poliA derivada de SV40 mediante digestión adicional con BamHI y se insertó en el sitio BamHI de pCI-neo-L36 o en el sitio BamHI de pCI-neo para construir pL36a-neo-lacZ y pNeo-lacZ, respectivamente. Se digirió el plásmido de control de pSEAP2 con Sall y se hicieron los extremos romos con fragmento de Klenow y después se ligó el ligador de BglII (5'-CAGATCTG-3', Takara Shuzo Co., Ltd., 4621P). Se escindió un fragmento de ADN de 2,3 kb que contenía promotor de gen temprano de SV40 + gen de SEAP + señal de poliA derivada de SV40 + secuencia potenciadora derivada de SV40 mediante digestión adicional con BglII y BamHI y se insertó en el sitio BamHI de pCI-neo-L36 o en el sitio BamHI de pCineo para construir pL36a-neo-SEAP y pNeo-SEAP, respectivamente.

Ejemplo 4: Cultivo celular y experimento de transfección

Con el fin de cultivar las células CHO, se añadió suero de ternero fetal (FCS; Gibco BRL, 26140-087) en la concentración final del 10% a α -MEM (Gibco BRL, 12571-063) al que se le habían añadido antibióticos (penicilina-estreptomicina, Gibco BRL, 15070-089) y se usó el medio como medio para subcultivo. Se sembraron las células CHO usadas en el experimento de transfección a una densidad de 5×10^5 en una placa que tenía un diámetro de 10 cm para cultivar células fijadas y se recuperaron tras tres días. Se sembraron las células recuperadas en una placa que tenía un diámetro de 6 cm a una densidad de 5×10^5 y se realizó la transfección mediante el método de lipofección tras 24 horas. Específicamente, se mezclaron 1 μ g del plásmido y 6 μ l de reactivo Lipofectamine (Gibco BRL, 18324-012), se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadió la mezcla gota a gota a las células que se habían movido a un medio sin antibióticos y suero. Tras 16 horas, se cambió el medio por el medio para subcultivo, se cultivaron las células adicionalmente durante 24 horas y se recuperaron y se seleccionaron las células transfectadas de modo que las células eran apropiadas para el marcador resistente a CYH y el marcador neo de control, respectivamente.

Cuando los clones transfectados se seleccionan basándose en la resistencia a CYH, se diluyeron las células recuperadas cuatro veces con un medio al que no se le había añadido CYH y se sembraron de nuevo en una placa que tenía un diámetro de 10 cm. Tras 24 horas, se cambió el medio por el que contenía CYH (3 mg/ml) y se continuó el cultivo durante 2-3 semanas adicionales. Se aislaron las colonias resistentes a CYH resultantes con un aro de clonación, se sembraron de nuevo en una placa de 24 pocillos y después se cultivaron en el medio al que no se le había añadido CYH. Además, los clones, en los que se había transducido la resistencia a CYH, podían aislarse diluyendo las células y cultivando las células en una placa de 24 pocillos tras el experimento de transducción. Es decir, se sembraron las células recuperadas en aproximadamente 10 placas de 24 pocillos y se cultivaron en presencia de CYH. Tras cultivar durante 1 semana, se recuperaron las células con el fin de eliminar las células sensibles a CYH. Se cultivaron de nuevo las células recuperadas en placas de 24 pocillos para un cultivo adicional durante 1 semana y así pudo aislarse rápidamente la cepa resistente a CYH.

Cuando los clones transformados se seleccionan basándose en la resistencia a G418, se diluyeron las células recuperadas tras la transfección hasta 50 veces con un medio que contenía G418 (1 mg/ml, Gibco BRL, 11811-049) y se sembraron de nuevo en una placa que tenía un diámetro de 10 cm. Se llevó a cabo el cultivo durante 1-2 semanas hasta que se habían formado las colonias. Se aisló una colonia individual con un aro de clonación tal como se describió anteriormente y se sembró de nuevo en placas de 24 pocillos para cultivar en un medio que contenía G418. Además, fue posible aislar los clones resistentes mediante el método de dilución de manera similar a la cepa resistente a CYH. En la resistencia a G418, se sembraron células en placas de 96 pocillos y se cultivaron en un medio que contenía G418 durante 1-2 semanas para aislar los clones resistentes a G418.

Ejemplo 5: Comparación de expresiones de gen de GFP

Se aislaron clones transfectados con aro de clonación. En el caso de la selección de CYH, se sembraron las células transfectadas de nuevo en placas de 24 pocillos y se cultivaron en ausencia de CYH durante 24 horas y después se cambió el medio por aquél en el que se había añadido CYH para cultivar durante 1 semana y se realizó tratamiento con tripsina para recuperar las células. En el caso de selección de G418, se sembraron las células de nuevo en placas de 24 pocillos, se cultivaron en un medio que contenía G418 durante 1 semana y después se recuperaron. Se prepararon las células recuperadas en suspensiones celulares de 10^5 - 10^7 células/ml con PBS que tenía el 0,5% de FCS y yoduro de propidio (PI; Pharmingen, 66211E) añadidos a la misma y se analizaron el recuento celular y las expresiones de GFP mediante citometría de flujo (FACS; FACScan, Beckton Dickinson). Dado que se observa una correlación muy alta entre la cantidad de expresión de GFP y la intensidad de fluorescencia obtenida mediante análisis de FACS, puede contemplarse la intensidad de fluorescencia como la expresión de GFP (Meng, Y. G., 2000, Subramanian & Srienc, 1996). Específicamente, se midieron 5×10^4 células y se realizan histogramas en relación con el número de células y la intensidad de fluorescencia derivada de GFP tal como se ilustra en la figura 6. Se clasificaron las intensidades de fluorescencia en cuatro regiones en el orden creciente de M1 - M4 y las células incluidas en la región M1 se consideraron como el grupo de células en las que GFP no se expresa, mientras que las células incluidas en las regiones M3 y M4 se consideraron como el grupo de células en las que la expresión de GFP es positiva. Si la intensidad de fluorescencia es demasiado alta, supera el intervalo de medición y por tanto el número de células de una cepa con alta expresión se calcula de manera excesivamente baja. Con el fin de evitar tal problema, se representó la cantidad de expresión de GFP mediante la razón del número de células calculada con la ecuación I:

(Ecuación 1): Razón de células positivas para GFP = (número de células contenidas en el intervalo M3-M4)/(número de células contenidas en el intervalo M1-M4)

Como resultado del análisis de 44 clones resistentes a CYH y 46 clones resistentes a G418, que se obtuvieron como control transfiriendo pd2EGFP-N1, el 43% de la cepa resistente a CYH seleccionada aleatoriamente mostró una expresión superior a la de todos los clones resistentes a G418, tal como se ilustra en la figura 7. Por tanto, se ha confirmado que la selección de resistencia a CYH produce los clones en los que el gen de GFP se expresa altamente de manera más eficaz que la selección de resistencia a G418.

En el caso del cultivo selectivo de las células CHO que tienen pL36-neo-GFP transfectedo en las mismas en un medio que tiene G418 añadido al mismo, se obtuvo el mismo resultado que el obtenido mediante transfección de pd2EGFP-N1 y por tanto se cree que la adquisición eficaz de los clones en los que el gen de GFP se expresa altamente es un efecto obtenido específicamente en el cultivo selectivo con el gen de L36a-CYH^R y CYH (no se muestra ningún dato).

Ejemplo 6: Comparación de la expresión del gen de fosfatasa alcalina

Se aislaron las células transfectadas mediante el método de dilución. Se aisló cada uno de los 50 clones resistentes a CYH y clones resistentes a G418 mediante transfección de pL36a-neo-SEAP y pNeo-SEAP en células, respectivamente, y se cultivó cada clon en el medio selectivo en placas de 24 pocillos hasta un nivel confluyente al 90% para analizar las expresiones de SEAP.

Se midieron las expresiones de SEAP por triplicado de manera continua tal como se muestra a continuación.

Se cultivó cada clon y se sembraron $2,5 \times 10^4$ células en una placa de 96 pocillos y se cultivaron en 200 μ l del medio selectivo que tenía el fármaco añadido al mismo durante 48 horas. Tras lavar cada clon con PBS(-), se contó la concentración celular de la suspensión celular con reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer Mannheim, 1-644-807). Se almacenó el sobrenadante tras el cultivo a -80°C para su medición en el futuro. Se midió la actividad enzimática de SEAP con el kit de detección de quimioluminiscencia de SEAP The Great Escape (Clontech, K2041-1). Se midió la quimioluminiscencia con un luminómetro de placa CT-9000D fabricado por Dia-iatron. Se midió cuantitativamente la cantidad de SEAP con una curva de calibración realizada usando la SEAP de patrón incluida en el kit. Se calculó la cantidad de expresión de SEAP de cada clon con la siguiente ecuación 2, siendo N_0 el número de células en la siembra, N el número de células al final del cultivo.

(Ecuación 2): Cantidad de expresión de SEAP (μ g/ 10^6 células/día) = {cantidad de SEAP en el medio (μ g)} $\times 10^6 \times (\ln N - \ln N_0) / (N - N_0) \times 2$ (días)

Se ha encontrado en el análisis de la cantidad de expresión de cada clon que aunque el 54% de los clones resistentes a CYH totales mostró cantidades de expresión de 5 mg/ 10^6 células/día o más, sólo el 8% de los clones resistentes a G418 totales mostró las cantidades equivalentes. Además, también se ha encontrado que el 20% de los clones resistentes a CYH mostró las cantidades de expresión de 30 mg/ 10^6 células/día o más y el 6% mostró las cantidades de expresión de 100 mg/ 10^6 células/día o más (figura 8). Se ha confirmado a partir de estos resultados que también pueden adquirirse eficazmente clones con alta expresión en las líneas celulares transfectadas de manera estable con gen de SEAP en el caso de selección basada en la resistencia a CYH.

Ejemplo 7: Comparación de expresión del gen de β -galactosidasa

Se aislaron las células transfectadas mediante el método de dilución. Se aislaron 50 clones resistentes a CYH y 53 clones resistentes a G418 mediante transfección de pL36a-neo-lacZ y pNeo-lacZ, respectivamente, en las células CHO.

Se midió la actividad de β -galactosidasa con el kit de β -gal luminiscente II (Clontech, K2048-1). Específicamente, se sembraron las células de cada clon cultivado a una densidad de 5×10^5 en una placa que tenía un diámetro de 6 cm y se cultivaron en un medio selectivo que tenía un fármaco añadido al mismo durante 2 días. Se recuperaron las células, se lisaron con una disolución de lisis incluida en el kit para preparar un lisado celular para el ensayo.

Se ha encontrado en el análisis de la cantidad de expresión de β -galactosidasa en cada clon que aunque el 16% mostró una actividad de 100 pg/ 10^6 células/2 días o más en los clones resistentes a CYH, sólo el 2% mostró las cantidades de expresión equivalentes en el clon resistente a G418. Además, también se ha encontrado que algunos clones en los clones resistentes a CYH mostraron una actividad que superaba 1000 pg/ 10^6 células/2 días y la cepa con alta expresión también puede adquirirse eficazmente en las líneas celulares en las que se ha transferido de manera estable lacZ en el caso de selección basada en la resistencia a CYH (figura 9).

Ejemplo 8: Medición de la tasa de crecimiento celular

Se compararon los clones resistentes a CYH y los clones resistentes a G418 en cuanto a las tasas de crecimiento en las condiciones de presencia y ausencia de fármaco. Se seleccionaron aleatoriamente 15 clones de cada uno de los clones resistentes a CYH y clones resistentes a G418 en los que se ha transfectado de manera estable un gen de SEAP y se subcultivaron en un medio selectivo (que contenía 3 mg/ml de CYH o 1 mg/ml de G418) y en un medio no selectivo, respectivamente. Específicamente, cada uno de los clones se sembró en 4-5 placas de cultivo que tenían un diámetro de 10 cm a una densidad de 5×10^5 células y se retiraron las células de una de las placas cada día para contar el número células. El recuento de células en la suspensión se llevó a cabo con un hemocitómetro, un reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer Mannheim, 1-644-807) o FACS. En la estimación con FACS, se tiñeron las células suspendidas en PBS (-) complementada con el 2% de FCS con diacetato de fluoresceína (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 067-03311) en células vivas y con yoduro de propidio (PI; Pharmingen, 66211E) en células muertas y se sometieron a análisis de FACS para contar las células que tenían señales verdes. Según las operaciones descritas anteriormente, se realizó una curva de crecimiento durante 4-5 días y se calculó un crecimiento para un determinado periodo de tiempo en cada uno de los clones.

Se calculó la tasa de crecimiento (g) del clon resistente a fármaco así obtenido según la siguiente ecuación 3, siendo N_0 el número de células en la fase temprana, N el número de células al final del cultivo y t los días de cultivo.

(Ecuación 3): $g = (\ln N - \ln N_0) / t$

Se calculó el número de generación (x) según la siguiente ecuación 4.

(Ecuación 4): $x = (\log_{10} N - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2$

Se calculó el tiempo de duplicación dividiendo el tiempo de cultivo de las células entre el número de generación.

Se ha confirmado en la curva de crecimiento que cualquiera del clon resistente a CYH y el clon resistente a G418 tienden a crecer rápidamente en el medio no selectivo mientras que crecen lentamente en el medio selectivo, pero no se observaron grandes diferencias entre genes marcadores y fármacos (figura 10). Con el fin de un análisis adicional de este punto, se sembraron cada uno de los clones resistentes a CYH y los clones resistentes a G418 en una placa que tenía un diámetro de 10 cm a una densidad de 5×10^5 células y se cultivaron durante 3 días. Se calculó el número de generación contando las células tras el final del cultivo y se calculó el tiempo de duplicación promedio por generación a partir del tiempo de cultivo. Además, se calculó el tiempo de duplicación promedio de cada uno de los clones en el medio selectivo y el medio no selectivo repitiendo el subcultivo varias veces. Se ha encontrado en la comparación de los valores promedio de los tiempos de duplicación promedio en 15 clones resistentes a CYH y 15 clones resistentes a G418, respectivamente, en el medio selectivo y el medio no selectivo que el tiempo de duplicación promedio en el medio selectivo que contiene fármacos es más largo en comparación con el del medio no selectivo (figura 11). Además, no se observaron diferencias significativas en los tiempos de duplicación promedio en las condiciones selectivas entre dos tipos de clones resistentes a fármaco y las condiciones no selectivas, y por tanto se cree que no había ninguna diferencia de crecimiento presente debida a las clases de genes marcadores selectivos. Además, también se calculó el tiempo de duplicación promedio en células CHO no transformadas, pero se ha encontrado que es algo más corto que el de las células transformadas.

Se concluye a partir de estos exámenes que los efectos del gen marcador de la presente invención sobre el crecimiento de las células son equivalentes a los de los genes marcadores ampliamente usados.

Ejemplo 9: Estabilidad del gen transducido

En cuanto a los clones resistentes a CYH y resistentes a G418 en los que se ha transducido el gen de SEAP, se sembraron cada uno de 6 clones en los que SEAP se expresa altamente en una placa que tenía un diámetro de 10 cm a una densidad de 5×10^5 células y se cultivaron en un medio no selectivo durante 4 días. Tras cultivar, se recuperaron las células, se contaron con FACS según el método descrito en el ejemplo 8 y se sembraron de nuevo en una placa que tenía un diámetro de 10 cm a una densidad de 5×10^5 células. Se sometió el sobrenadante del cultivo a un ensayo de SEAP. Se repitió la operación de subcultivo 8 ó 9 veces y se midieron las expresiones de SEAP en cada periodo (excepto el primer subcultivo de la cepa resistente a G418) para comprobar la estabilidad del gen transferido.

La expresión de SEAP en los clones resistentes a CYH fue superior por un gran margen a la de las cepas resistentes a G418 y tal tendencia no varió con subcultivos repetidos en el medio no selectivo (figura 12). Algunos de los clones en los que SEAP se expresa altamente entre los clones resistentes a CYH disminuyeron la cantidad de expresión, pero la cantidad de expresión incluso tras 8 ciclos de subcultivo en el medio no selectivo siguió estando a un nivel superior al de las expresiones de SEAP en el segundo subcultivo de los clones con alta expresión de SEAP resistentes a G418. Se ha encontrado a partir de estos resultados que el gen insertado en el cromosoma es estable en las células CHO en las que se ha transducido de manera estable un gen foráneo mediante el marcador resistente a CYH novedoso. Por tanto se ha confirmado que el gen marcador de L36a-CYH^R es más útil que el gen marcador

de tipo gen neo ampliamente usado.

Ejemplo 10: Análisis del número de copias de gen foráneo transducido

Entre los clones transducidos con gen de SEAP, se sometieron 8 clones resistentes a G418 y 12 clones resistentes a CYH al análisis del número de copias del gen de SEAP mediante PCR cuantitativa. Se preparó el ADN genómico de las células CHO con el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, A1120). Se midió cuantitativamente la concentración del ADN genómico preparado midiendo la absorbancia a 260 nm. Además, se confirmó mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% que no se observaba degradación en el ADN y después se usó el ADN como molde de PCR cuantitativa.

Se llevó a cabo PCR cuantitativa con The Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Molecular Biochemicals, 3-003-230) en 45 ciclos en las condiciones de 15 segundos a 95°C, 5 segundos a 57°C y 10 segundos a 72°C por ciclo. El cebador usado fue el directo de SEAP (5'-GGT TAC CAC TCC CAC TGA CTT CC-3', SEQ ID NO: 9) y el inverso de SEAP (5'-GCA ACT TCC AGA CCA TTG GC-3', SEQ ID NO: 10). Con el fin de normalizar los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa con cebador de SEAP, se llevó a cabo PCR de la misma manera que anteriormente con el cebador directo (5'-ATG GGT CAG AAG GAT TCC TA-3') y el cebador inverso (5'-TCC ATG TCG TCC CAG TT-3') para β -actina que se incluye en el kit de detección de β -actina de baliza molecular Sentinel (Stratagene, 200570). Se llevó a cabo PCR con el ADN de molde de cada uno de los clones con dos combinaciones de los cebadores. Con respecto a las cantidades de los productos de reacción de PCR del gen de SEAP y el gen de β -actina, se calcularon los valores relativos entre clones basándose en 1 como cada uno de los valores mínimos. Además, se dividió el valor relativo del producto de PCR obtenido con el cebador de SEAP con respecto al ADN de cada clon entre el valor relativo del producto de PCR obtenido con el cebador de β -actina, lo que se consideró como las copias de gen de SEAP relativas por cantidad de ADN genómico unitario de cada clon. La relación entre las copias de gen de SEAP relativas de cada clon y las expresiones de SEAP en el clon se ilustra gráficamente en la figura 13, pero no se observó ninguna correlación entre las copias de gen y las expresiones de SEAP. Se ha considerado posible a partir de los resultados que la alta expresión de un gen reconocido frecuentemente en la cepa resistente a CYH es el efecto complicado no sólo de las copias, sino también de la posición de un ADN de gen foráneo insertado en el cromosoma y de otros factores.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, en particular, células recombinantes en las que la proteína deseada se expresa a un alto nivel se seleccionan con una alta frecuencia seleccionando una célula transfectada con un vector que contiene un gen marcador selectivo novedoso (gen resistente a inhibidor de síntesis de proteínas, normalmente gen resistente a cicloheximida). Usando el vector es posible reducir el número de células transfectadas que se requiere examinar con el fin seleccionar una cepa con alta expresión.

Además, se espera que el vector descrito anteriormente que puede adquirir eficazmente células en las que un gen foráneo se expresa altamente en poco tiempo constituya una gran contribución al análisis de funciones de una proteína que tiene funciones desconocidas codificada por el gen y al desarrollo del sistema de producción de proteínas recombinantes que pueden usarse como productos farmacéuticos.

Lista de secuencias

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> Nuevo vector para células animales y uso del mismo

<130> 136045

<160> 10

<210> 1

<211> 333

<212> ADN

<213> humano

<223> gen de proteína ribosómica L36a

<400> 1

tctaga atg gtc aac gta cct aaa acc cga aga acc ttc tgt aag aag 48

Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys Lys

5

10

tgt ggc aag cat cag cct cac aaa gtg aca cag tat aag aag ggc aag

Cys Gly Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys Gly Lys

15

20

25

30

gat tct ttg tat gcc cag gga agg agg cgc tat gat cgg aag cag agt

Asp Ser Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser

35

40

45

ggc tat ggt ggg cag aca aag caa att ttc cgg aag aag gct aag acc

Gly Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr

50

55

60

aca aag aag att gtg cta agg ctg gaa tgt gtt gag cct aac tgc aga

Thr Lys Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg

65

70

75

tcc aag agg atg ctg gcc att aag aga tgc aag cat ttt gaa ctg gga

Ser Lys Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly

80

85

90

gga gat aag aag aga aag ggc caa gtg atc cag ttc taatctaga 333

Gly Asp Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe

95

100

105

<210> 2

5

<211> 333

<212> ADN

10

<213> humano

<223> gen de proteína ribosómica L44

<400> 2

tctaga atg gtc aac gta cct aaa acc cga aga acc ttc tgt aag aag 48

Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys Lys

5

10

tgt ggc aag cat cag cct cac aaa gtg aca cag tat aag aag ggc aag

Cys Gly Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys Gly Lys

15

20

25

30

gat tct ttg tat gcc cag gga agg agg cgc tat gat cgg aag cag agt

Asp Ser Leu Tyr Ala Gln Gly Lys Arg Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser

35

40

45

ggc tat ggt ggg cag aca aag caa att ttc cgg aag aag gct aag acc

Gly Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr

50

55

60

aca aag aag att gtg cta agg ctg gaa tgt gtt gag cct aac tgc aga

Thr Lys Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg

65

70

75

tcc aag agg atg ctg gcc att aag aga tgc aag cat ttt gaa ctg gga

Ser Lys Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly

80

85

90

gga gat aag aag aga aag ggc caa gtg atc cag ttc taatctaga 333

Gly Asp Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe

5

95

100

105

<210> 3

<211> 20

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<400> 3

ES 2 403 931 T3

	AGAAGTGTGG CAAGCATCAG	20
	<210> 4	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<400> 4	
	CTCCTCCCAG TTCAAAATGC	20
15	<210> 5	
	<211> 29	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<400> 5	
25	GGGTCTAGAA TGGTCAACGT ACCTAAAAC	29
	<210> 6	
	<211> 25	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<400> 6	
	CCGGAAAATT TGCTTTGTCT GCCCA	25
40	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<400> 7	
	GGGCAGACAA AGCAAATTTT CCGG	24
50	<210> 8	
	<211> 29	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 8	
60	GGGTCTAGAT TAGAACTGGA TCACTTGGC	29
	<210> 9	
65	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<400> 9	
	GGTTACCACT CCCACTGACT TCC	23
10	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<400> 10	
20	GCAACTTCCA GACCATTGGC	20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una proteína, caracterizado por cultivar células transformadas que comprenden una célula animal que contiene un vector de expresión que contiene un gen de resistencia a inhibidor de síntesis de proteínas de los siguientes (i) o (ii) y un gen estructural de proteína foránea en estado expresable y recoger la proteína foránea expresada,
- 5
- (i) que puede conferir resistencia a cicloheximida como inhibidor de síntesis de proteínas a células animales derivadas de un mamífero sensible al inhibidor y codifica para una secuencia de aminoácidos tal como se codifica por el ADN de SEQ ID NO: 1, o
- 10
- (ii) que puede conferir resistencia a cicloheximida como inhibidor de síntesis de proteínas a células animales derivadas de un mamífero sensible al inhibidor y codifica para una proteína homóloga al 90% o más a una proteína tal como se describió en (i) y en el que el aminoácido correspondiente a la posición 54 tal como se codifica por el
- 15
- ADN de SEQ ID NO: 1 es glutamina.

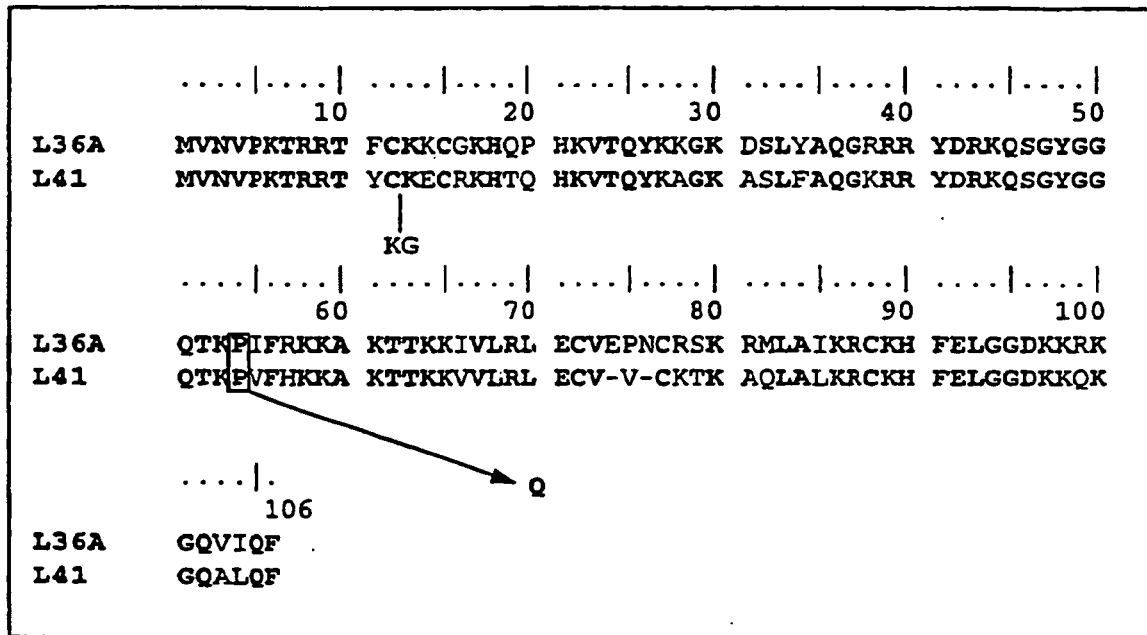


FIG. 1

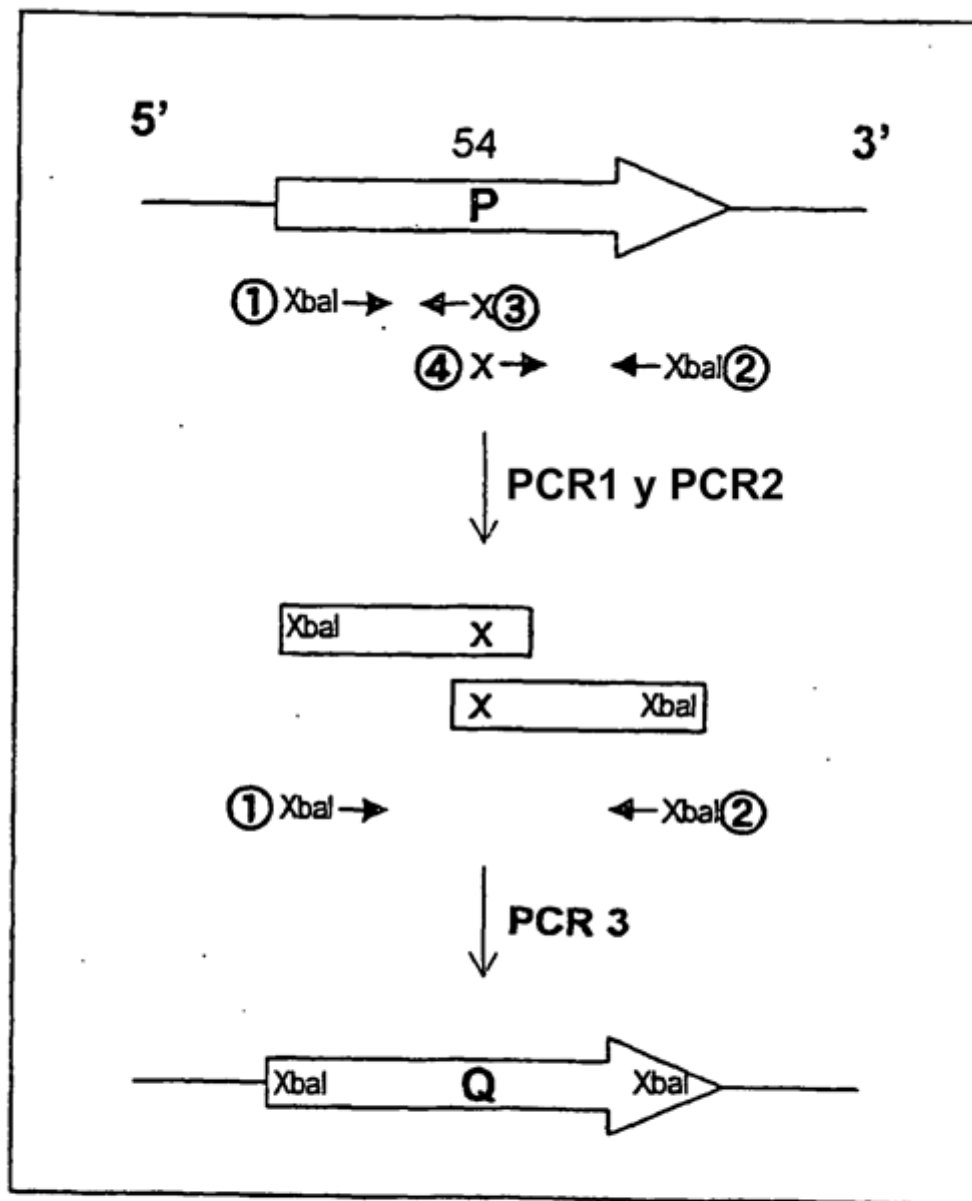


FIG. 2

1	TCTAGA	ATG GTC AAC GTA CCT AAA ACC CGA AGA ACC TTC TGT AAG	45
	XbaI	Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys	13
46	AAG TGT GGC AAG CAT CAG CCT CAC AAA GTG ACA CAG TAT AAG AAG	90	
14	Lys Cys Gly Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys	28	
91	GGC AAG GAT TCT TTG TAT GCC CAG GGA AGG AGG CGC TAT GAT CGG	135	
29	Gly Lys Asp Ser Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Asp Arg	43	
136	AAG CAG AGT GGC TAT GGT GGG CAG ACA AAG CAA ATT TTC CGG AAG	180	
44	Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys	58	
181	AAG GCT AAG ACC ACA AAG AAG ATT GTG CTA AGG CTG GAA TGT GTT	225	
59	Lys Ala Lys Thr Thr Lys Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val	73	
226	GAG CCT AAC TGC AGA TCC AAG AGG ATG CTG GCC ATT AAG AGA TGC	270	
74	Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys	88	
271	AAG CAT TTT GAA CTC GGA GGA GAT AAG AAG AGA AAG GGC CAA GTG	315	
89	Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val	103	
316	ATC CAG TTC TAA TCTAGA 333		
104	Ile Gln Phe End XbaI		

FIG. 3

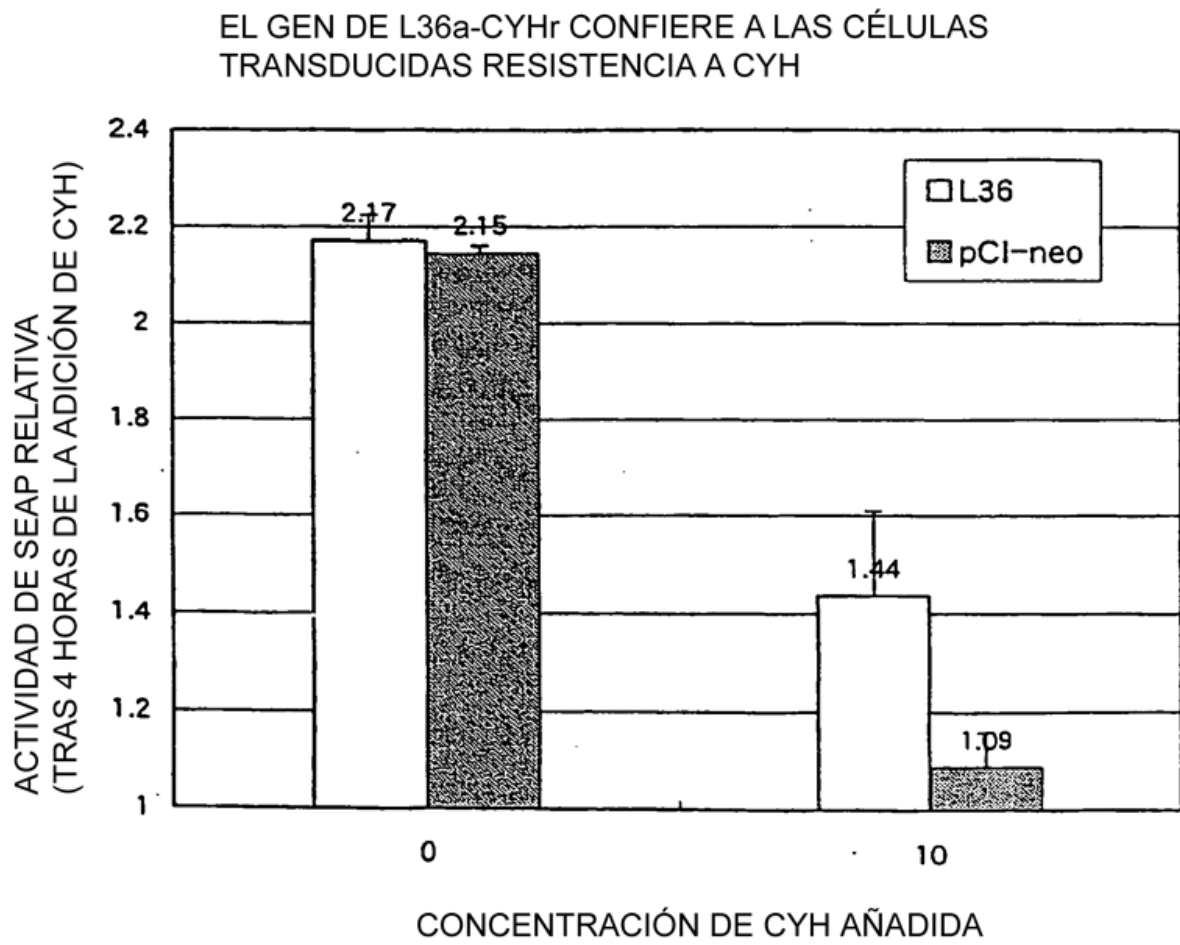


FIG. 4

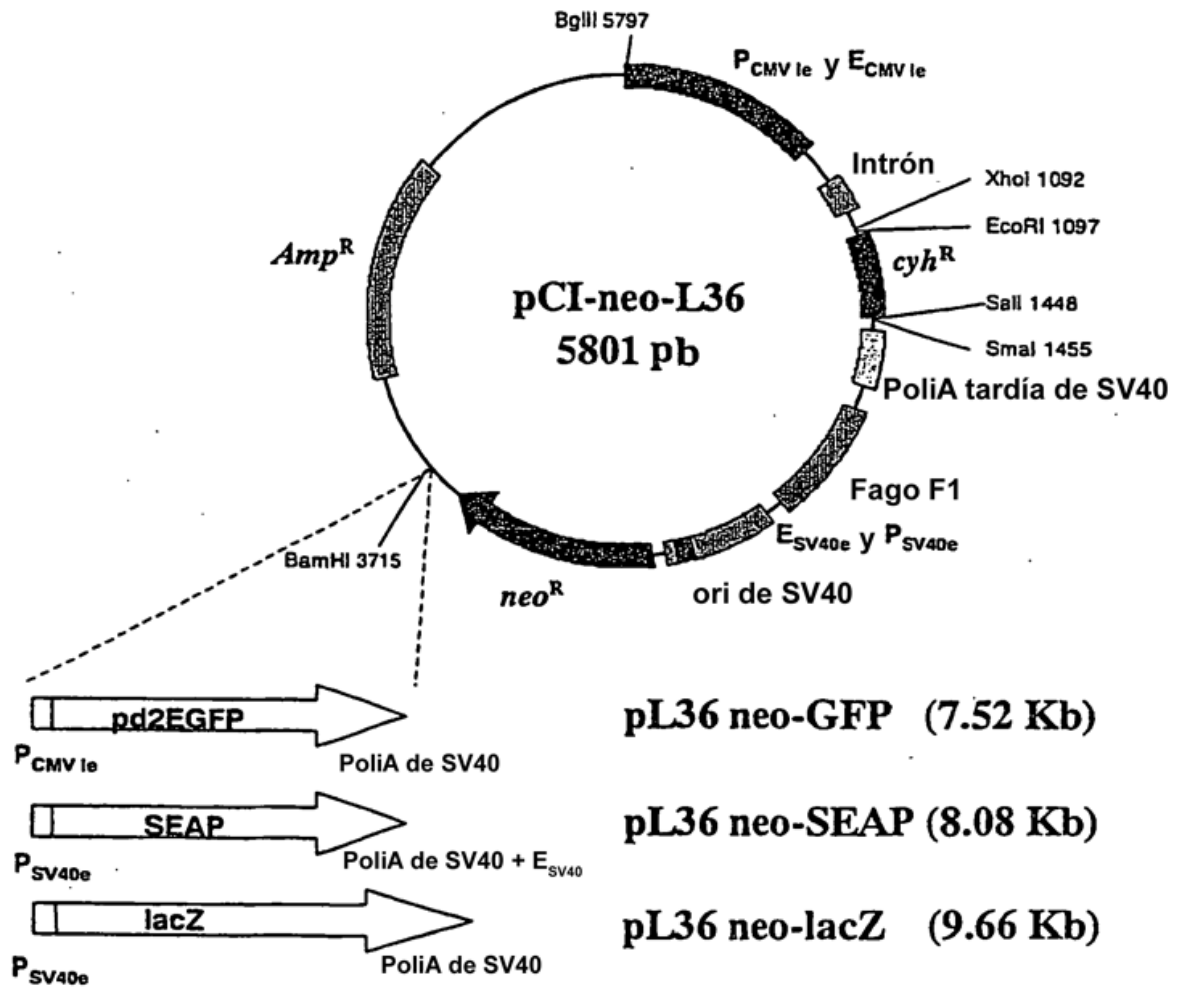


FIG. 5

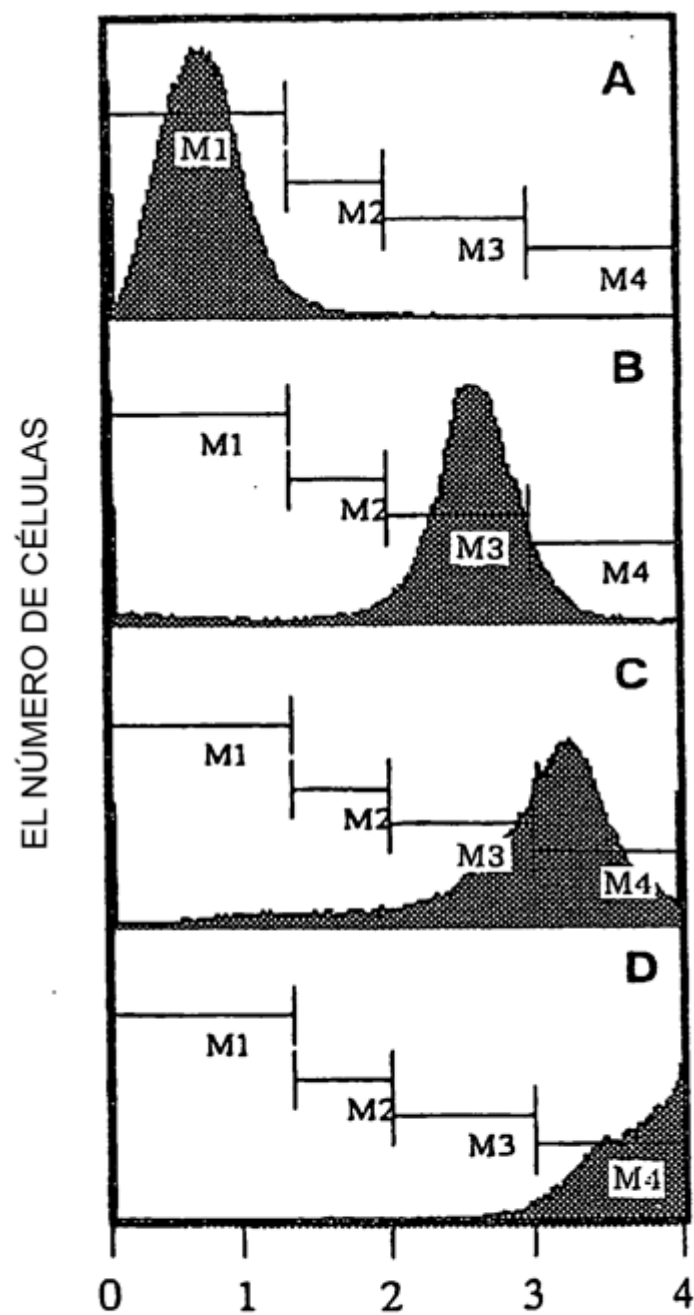


FIG. 6

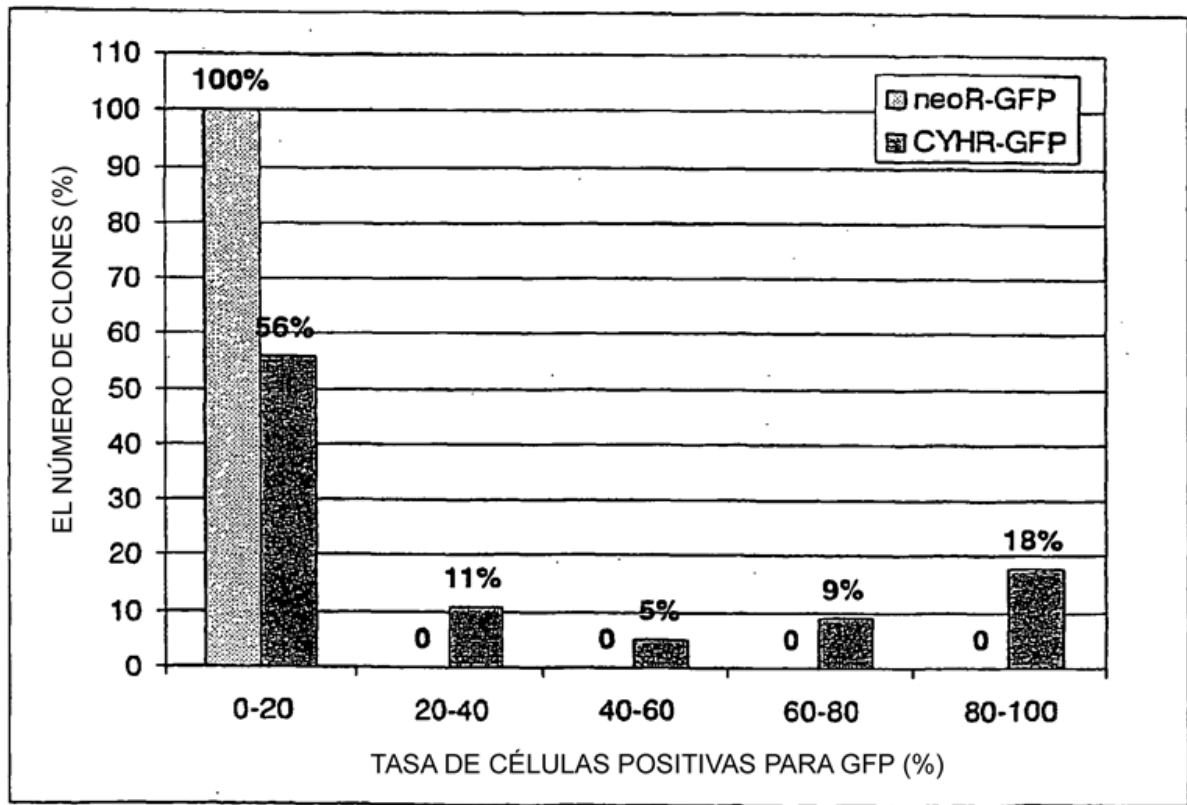


FIG. 7

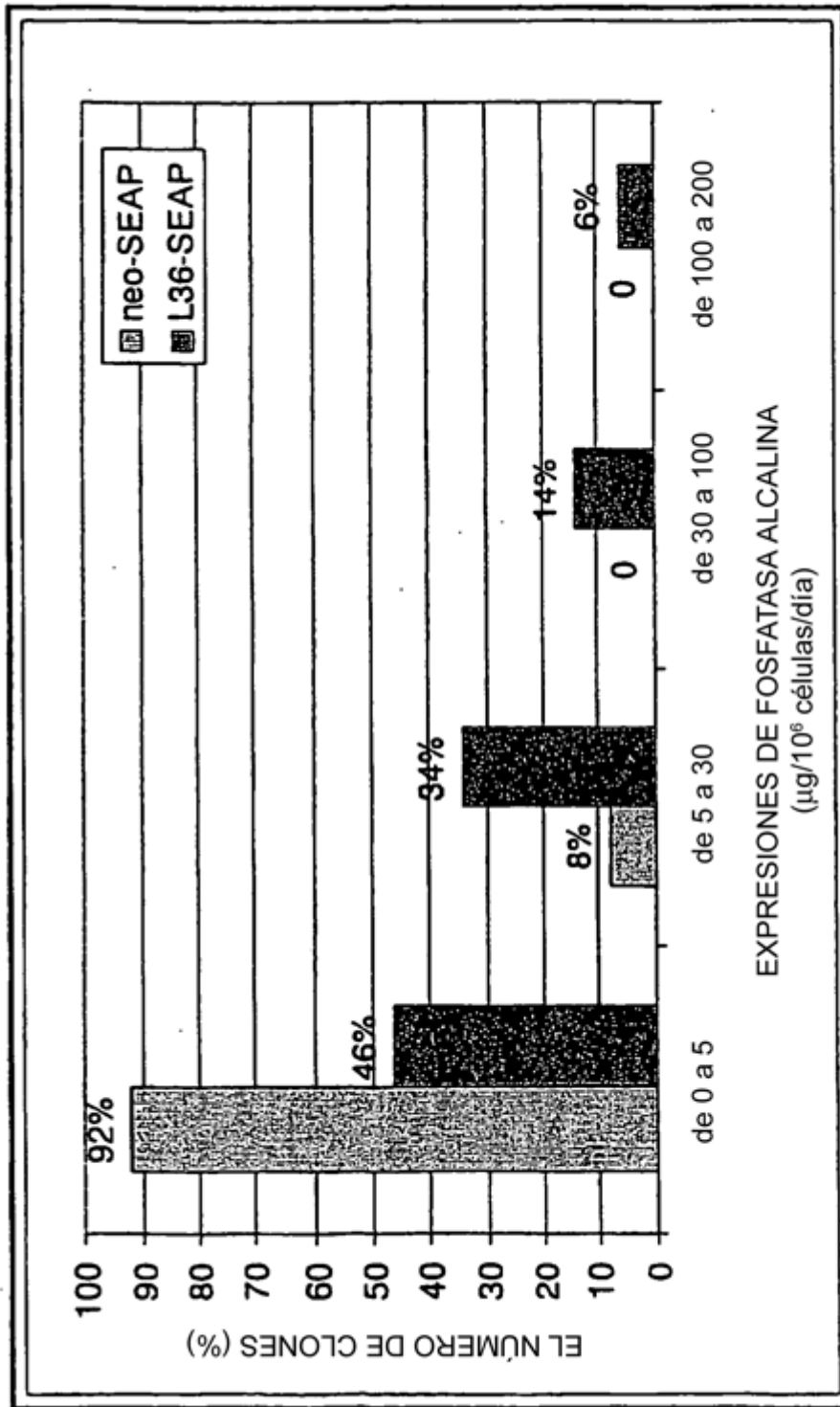
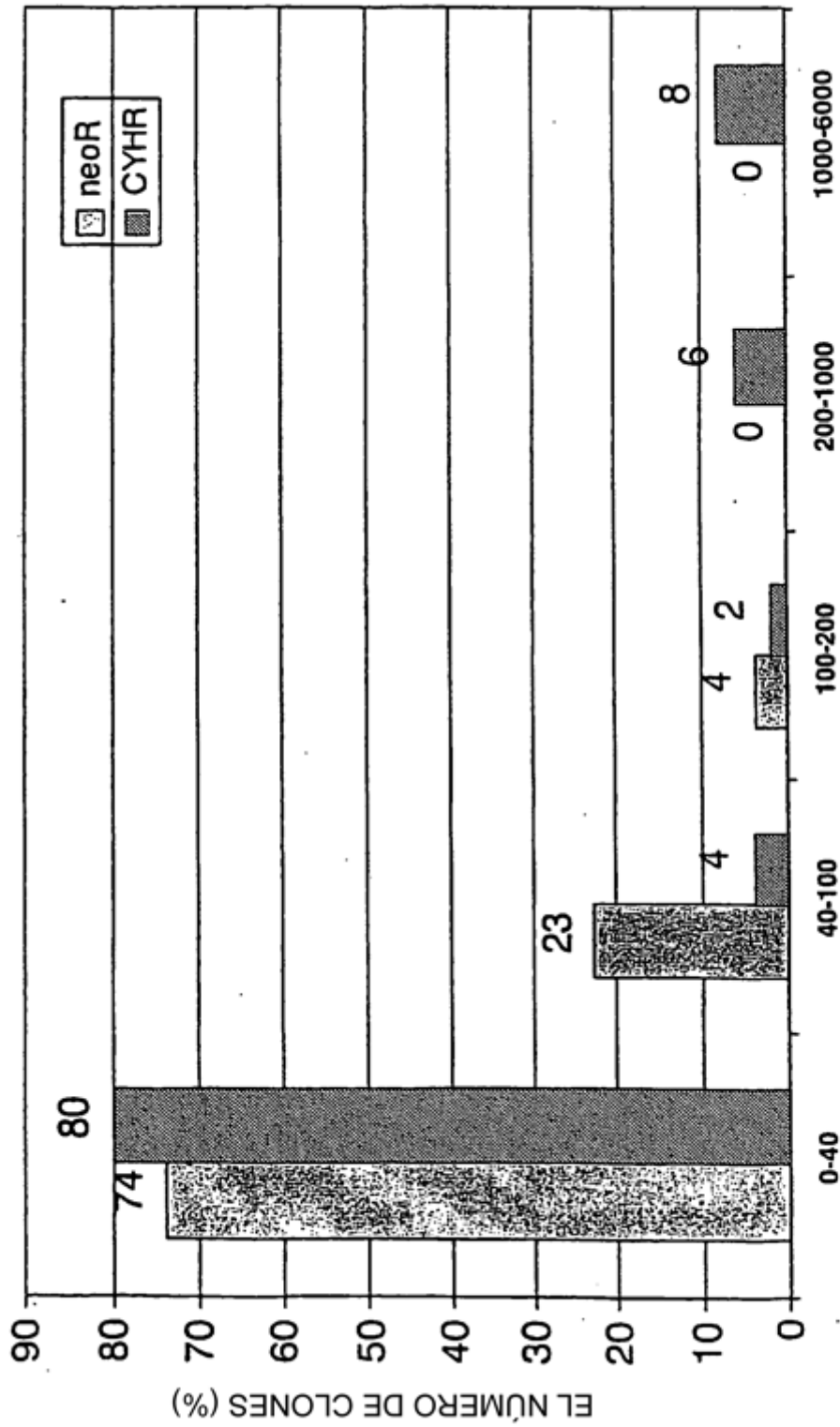


FIG. 8



EXPRESIONES DE β-GALACTOSIDASA (pg/10⁶ células/2 días)

FIG. 9

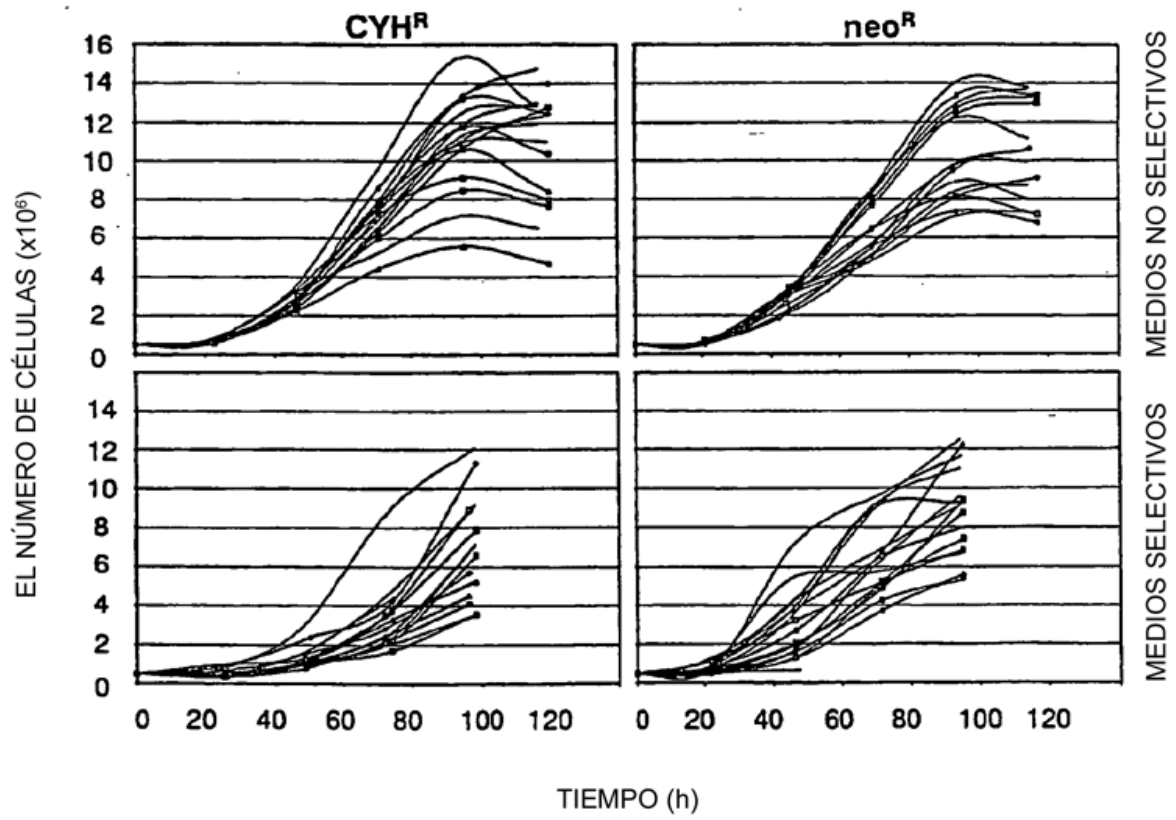


FIG. 10

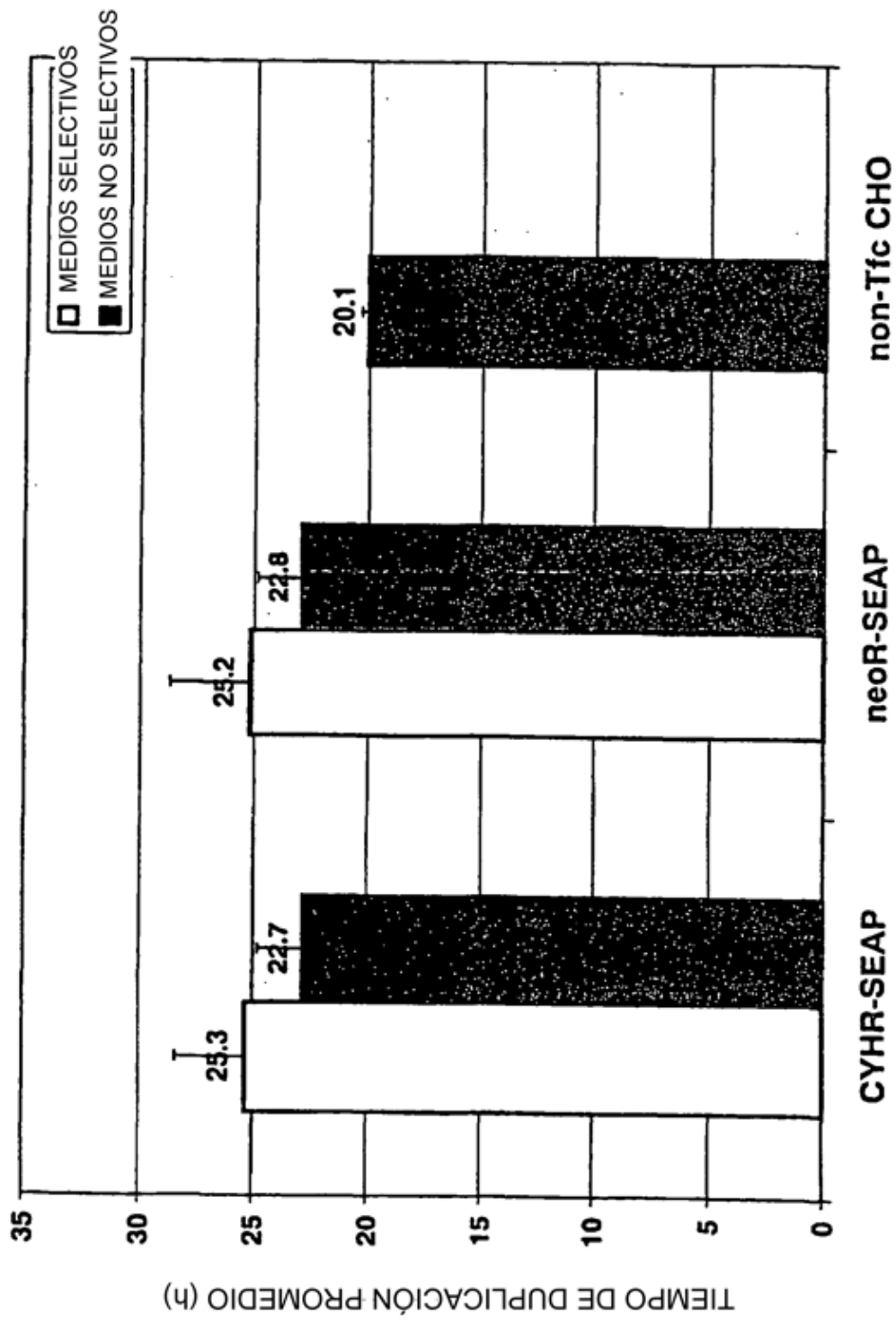


FIG. 11

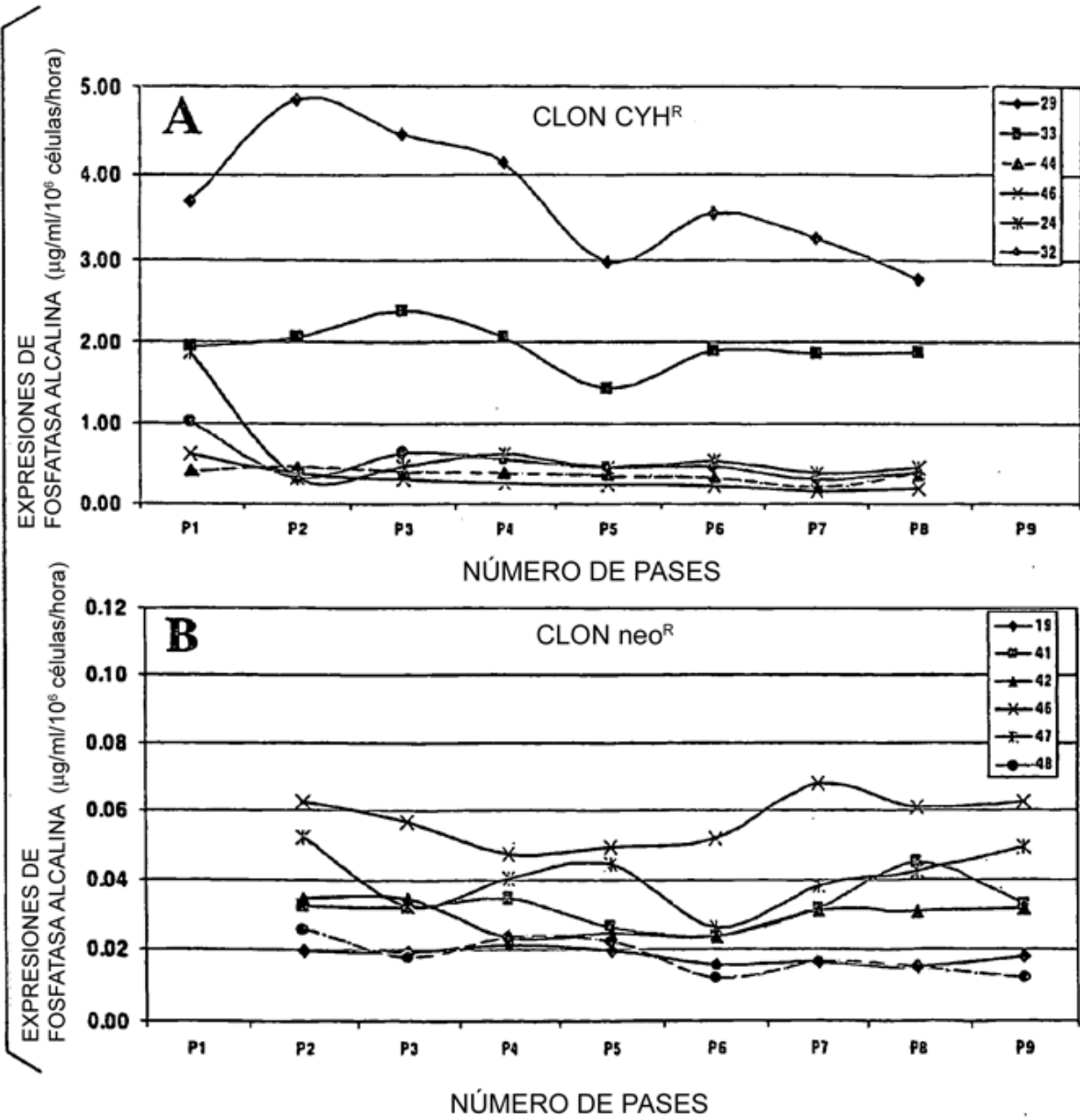


FIG. 12

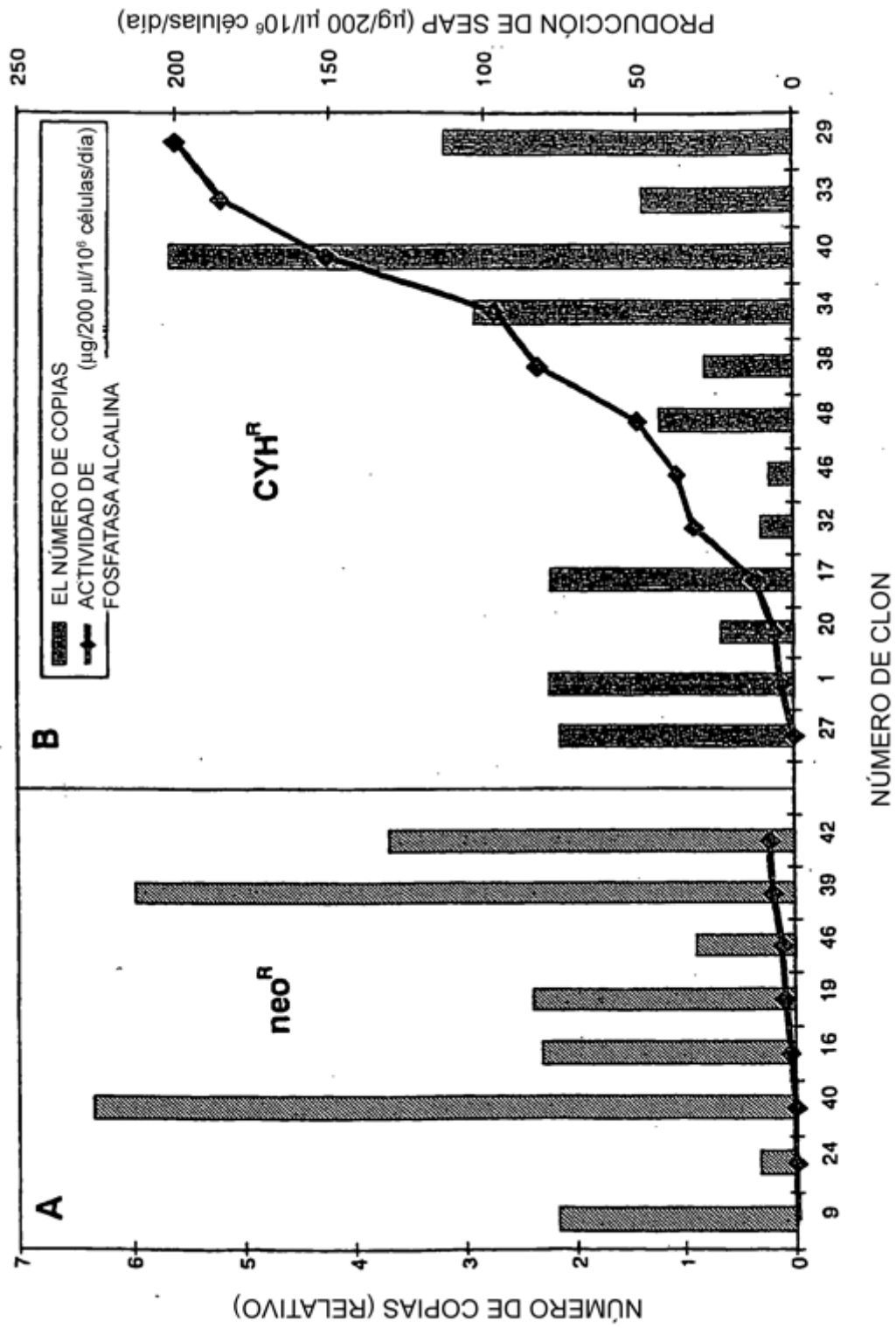


FIG. 13