

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 591**

51 Int. Cl.:

C12N 15/869 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 06806552 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1945781**

54 Título: **Expresión de proteínas en células de roedor**

30 Prioridad:

28.10.2005 EP 05023611

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

20.05.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**GOEPFERT, ULRICH y
KOPETZKI, ERHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 461 591 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

Expresión de proteínas en células de roedor

5 La presente invención se refiere a la expresión de proteínas heterólogas en células de roedor. El ácido nucleico codificante de proteína se proporciona en un episoma bajo el control y mantenimiento del sistema oriP/EBNA-1 del virus de Epstein-Barr, en el que tanto oriP como el gen estructural de EBNA-1 se encuentran situados en diferentes elementos en el interior de la célula.

10 **Antecedentes tecnológicos**

El papel e impacto de los procedimientos de producción biotecnológica ha ganado en importancia en los últimos años. Simultáneamente a la creciente importancia de los procedimientos biotecnológicos se ha incrementado de manera constante la complejidad de los productos fabricados.

15 Son posibles células huésped para la expresión de proteínas heterólogas, HEK (renales embrionarias humanas), HeLa (Henrietta Lacks), COS (células renales de mono verde africano transformadas por SV40) y células CHO (de ovario de hámster chino), debido a que las proteínas heterólogas expresadas en estos huéspedes pueden plegarse, procesarse, ser maduradas por proteasas, glucosilarse y sulfatarse según el patrón de las células humanas (ver, por ejemplo, Watson E. *et al.*, *Glycobiol.* 4:227-37, 1994).

20 El virus de Epstein-Barr (VEB) es un patógeno de los linfocitos B humanos. Pertenece a la clase de los virus herpes humanos (Herpesviridae). Los linfocitos B transformados por VEB pueden propagarse de manera desregulada (Miller G., *Virology*, editado por Fields B., Raven Press, N.Y., 1985, páginas 563 a 590). Un elemento característico de las células transformadas por VEB es la expresión de las denominadas proteínas antígenos nucleares del virus de Epstein Barr (EBNA). Se han identificado seis variantes diferentes de estas proteínas hasta el momento.

25 La proteína EBNA-1 desempeña un papel importante en el ciclo de replicación del ácido nucleico del VEB en las células transformadas. En combinación con un segundo elemento del VEB, el origen de replicación (oriP), que actúa en cis, se activa la replicación y mantenimiento de los episomas dentro de la célula (Lupton S. y Levine A.J., *Mol. Cell Biol.* 5:2533-2542, 1985; Yates J.L. *et al.*, *Nature (London)* 313:812-815, 1985).

30 El segmento de oriP está constituido de dos regiones: el elemento bivalente simétrico y la familia de repeticiones. El primero es un segmento de secuencia de 65 pb. Se encuentra separado en el ácido nucleico del virus por aproximadamente 1.000 pb de la familia de repeticiones. Este segundo elemento está compuesto de una secuencia de 30 pb que se encuentra repetida 20 veces (Hudson G.S. *et al.*, *Virology* 147:81-98, 1985; Reisman D. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:1822-1832, 1985).

35 La familia de 30 pb de repeticiones presenta la capacidad de incrementar la transcripción, mientras que el elemento bivalente simétrico desempeña un papel en la replicación. El segmento oriP completo ayuda a mantener el plásmido fuera del cromosoma.

40 La combinación de la proteína EBNA-1, es decir, una proteína iniciadora de acción en trans, y oriP, permite la construcción de plásmidos, los cuales, tras introducirse en una célula, se mantienen establemente en forma de episomas y se replican establemente durante la proliferación celular (ver, por ejemplo, Yates J.L. *et al.*, *Nature (London)* 313:812-815, 1985; Reisman D. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:1822-1832, 1985). Estos dos elementos aprovechan el mecanismo de replicación de la célula huésped para la replicación del episoma (Bode J. *et al.*, *Gene Ther. Mol. Biol.* 6:33-46, 2001).

45 Kryan P.J., *et al.* (*Mol. Cell. Biol.* 9:1026-1033, 1989) han demostrado que los plásmidos que comprenden la familia de repetición del origen de replicación del VEB pueden retenerse permanentemente en el núcleo celular de las células humanas. Por lo tanto, la presencia de la proteína EBNA-1 resulta suficiente; no se requiere ningún otro elemento del VEB (ver también Aiyar A. *et al.*, *EMBO J.* 17:6394-6403, 1998; Hung S.C. *et al.*, *PNAS* 98:1865-1870, 2001; Yates J.L., *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, editado por DePhamphilis M.L., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1996, páginas 751 a 774; Yates J.L. *et al.*, *J. Vir.* 74:4512-4522, 2000).

50 La proteína EBNA-1 une el episoma al cromosoma de la célula huésped durante la replicación del episoma y de esta manera garantiza la propagación del mismo durante la división celular.

60 Dicha relación mutua también es conocida para otros virus, por ejemplo el antígeno T grande del virus 40 del simio (SV40) y las proteínas E1/E2 del virus del papiloma bovino (VPB) (ver, por ejemplo, Gilbert D.M. *et al.*, *Cell* 50:59-68, 1987; DuBridge R.B. *et al.*, *Mutagen* 3:1-9, 1988; Lebkowski J.S. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:1951-1960, 1984).

5 La combinación de los elementos EBNA-1 y oriP del VEB se ha utilizado para la preparación de episomas de replicación autónoma extracromosómicos que no se integran. Horlick *et al.*, por ejemplo, han utilizado células HEK (renales embrionarias humanas) que expresan establemente la proteína EBNA-1 para la expresión del CRHR (receptor de hormona liberadora de corticotrofina) a partir de un plásmido que contiene oriP de VEB (Horlick R.A. *et al.*, Prot. Exp. Purif. 9:301-308, 1997).

En la patente US nº 4.686.186 se ha informado de un vector recombinante y un huésped eucariótico transformado con el mismo. Los elementos del VEB oriP y EBNA-1 se agruparon en el vector recombinante.

10 En el documento nº WO 2002/090533 se informa de un procedimiento para la producción de proteínas recombinantes mediante transfección transitoria de células renales embrionarias humanas cultivadas en suspensión (línea celular 293 y sus variantes genéticas). Los plásmidos que proporcionan el origen de replicación del VEB se mantienen extracromosómicamente.

15 En el documento nº WO 2004/053137 se informa de un método para la producción de polipéptidos recombinantes y/o moléculas de ARN no traducido en células huésped. El documento nº WO 2004/018506 informa de composiciones y métodos aplicables en un sistema de expresión regulable que se transfecta transitoriamente en células huésped de mamífero.

20 La solicitud de patente US nº 2002/0086419 informa de un vector recombinante para la persistencia estable del ADN exógeno en las células huésped eucarióticas y a los usos del vector recombinante para la producción estable a largo plazo de un producto génico en la célula huésped.

25 Un vector de expresión útil para la transfección de una célula huésped de mamífero seleccionada se informa en la patente US nº 5.707.830. El vector de expresión contiene una familia de repeticiones del virus de Epstein-Barr, una copia del gen EBNA-1 que puede expresarse funcionalmente en la célula huésped, un fragmento de ADN eucariótico, que proporciona la capacidad del vector de replicarse en la célula huésped, y un casete de expresión.

30 El documento nº WO 2002/027005 informa de un sistema de transfección mejorado que comprende un sistema de mantenimiento episómico, un promotor/intensificador fuerte, un sistema de transactivación de proteínas y un ADN codificante de una proteína heteróloga. Las líneas celulares preferentes no deben ser de roedor debido a que un plásmido que contiene oriP no se replica eficientemente y las células CHO, por ejemplo, no presentan factores celulares para el sistema de transactivación.

35 Wysokenski D.A. y Yates J.L., (J. Vir. 63:2657-2666, 1989) mencionan que la replicación del plásmido de VEB no cruza líneas específicas de células de primate con células de roedor. Ello se basa en la falta de una interacción con una proteína huésped que participa en la replicación del ADN, que falta en roedores.

40 Tomiyasu K-i., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 253:733-738, 1998; Mizuguchi H. *et al.*, FEBS Letters 472:173-178, 2000, y documento nº WO 2005/024030 informan de plásmidos que contienen tanto un oriP como un gen estructural de EBNA-1 conjuntamente con otros elementos.

45 La patente US nº 5.976.807 informa de un método para producir líneas celulares eucarióticas recombinantes que expresan múltiples proteínas e interés. Se obtienen células transfectadas que expresan una proteína EBNA-1 y que contienen por lo menos dos episomas transfectados.

Leight E.R. y Sugden B. (Mol. Cell. Biol. 21:4149-4161, 2001) informan del establecimiento de un replicón de oriP que depende de un suceso epigenético infrecuente.

50 Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona un sistema de expresión para la expresión de proteínas heterólogas en líneas de células CHO. Este sistema comprende el sistema episómico oriP/EBNA-1 de replicación y mantenimiento del virus de Epstein-Barr.

55 Concretamente, la invención proporciona una célula CHO, en la que la célula CHO:

- 60 a) expresa el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA1 se encuentra operablemente unida a un promotor fuerte y se integra en el ADN cromosómico y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB integrada en el ADN cromosómico;
- b) contiene un episoma, en el que dicho episoma comprende:

- (i) un origen de replicación procariótico;

(ii) un marcador de selección;
(iii) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como elemento único derivado del VEB y no contiene una copia funcional del gen estructural de EBNA-1;

5 (iv) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO, en el que:

dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicha proteína heteróloga y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación;

10 c) no contiene el antígeno T grande del virus del poliooma.

La presente invención proporciona además un método para obtener una célula CHO según la invención, en el que el método comprende las etapas de:

15 a) proporcionar una célula CHO que no contiene el antígeno T grande del virus del poliooma;
b) proporcionar un plásmido que comprende un origen de replicación procariótico, un marcador de selección y un casete de expresión funcional para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína EBNA-1 y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación, en el que el plásmido no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB;

20 c) introducir dicho plásmido b) en dicha célula CHO a);

d) seleccionar una célula CHO establemente transformada;

25 e) proporcionar uno o más plásmidos adicionales que comprenden un origen de replicación procariótico, un marcador de selección, un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como elemento único derivado del VEB, y un casete de expresión adecuado para la expresión de una proteína heteróloga en la célula de roedor transformada, en la que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante del polipéptido heterólogo y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación y ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1;

30 f) introducir dicho plásmido adicional e) en la célula CHO d);

g) repetir las etapas e) a f) hasta 5 veces.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de un polipéptido heterólogo, en el que dicho procedimiento comprende:

35 a) proporcionar una célula CHO según la invención;

b) cultivar la célula CHO bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido heterólogo;

c) recuperar el polipéptido heterólogo a partir del cultivo.

40 La presente invención proporciona además un kit para la producción de una célula CHO según la invención, en el que dicho kit comprende:

a) una célula CHO que no contiene el antígeno T grande del virus del poliooma;

45 b) un primer plásmido que comprende un origen de replicación procariótico, un marcador de selección y un casete de expresión funcional para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína EBNA-1 y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación, en el que el plásmido no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB;

50 c) un segundo plásmido que comprende un origen de replicación procariótico, un marcador de selección, un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como elemento único derivado del VEB, y un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en la célula de roedor, en la que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, un sitio de clonación para la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación y ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1.

55 En otra realización de la invención, la célula CHO se selecciona de entre el grupo que comprende las células CHO-K1, CHO-DXB11, CHO-DG44 y células CHO que expresan la proteína EBNA-1.

60 En otra realización de la presente invención, el polipéptido heterólogo que debe expresarse se selecciona de entre el grupo que comprende profármacos, enzimas, fragmentos de enzima, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos, polipéptidos biológicamente activos, proteínas hedgehog, proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas, interferones, inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina.

En una realización, dicho polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina.

En otra realización, la producción de la proteína heteróloga según la presente invención se lleva a cabo bajo transfección transitoria.

5

En otra realización, dicho polipéptido heterólogo se secreta al medio de cultivo.

En una realización adicional de la invención, el plásmido introducido en la célula CHO contiene por lo menos dos marcadores de selección, preferentemente por lo menos un marcador de selección procariótico y por lo menos un marcador de selección eucariótico.

10

En una realización adicional de la invención, el número de plásmidos introducido en una célula CHO es de entre uno y cinco plásmidos.

En otra realización de la invención, el número de plásmidos introducido en la célula CHO en la misma etapa es de entre uno y tres, preferentemente de entre uno y dos plásmidos.

15

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una célula CHO, en la que dicha célula CHO expresa el antígeno nuclear 1 del viru de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente unido a un promotor fuerte y se integra en el ADN cromosómico y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB integrada en el ADN cromosómico y contiene un episoma, en el que dicho episoma comprende:

20

(a) un origen de replicación procariótico;

b) un marcador de selección;

c) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como elemento único derivado del VEB y no contiene una copia funcional del gen estructural de EBNA-1;

25

d) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicho polipéptido heterólogo y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación;

30

y no contiene el antígeno T grande del virus del polioma.

35

Los métodos y técnicas útiles para llevar a cabo la presente invención se describen en, por ejemplo, Ausubel F.M., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, volúmenes I a III, 1997; Glover N.D. y Hames B.D., ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (1995), Oxford University Press; Freshney, R.I. (ed.), *Animal Cell Culture -a practical approach*, IRL Press, 1986; Watson J.D. *et al.*, *Recombinant DNA*, Second Edition, CHSL Press, 1992; Winnacker E.L., *From Genes to Clones*; N.Y., VCH Publishers, 1987; Celis J., ed., *Cell Biology*, segunda edición, Academic Press, 1998; Freshney R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, segunda edición, Alan R. Liss, Inc., N.Y., 1987.

40

Un "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico por lo menos parcialmente no natural codificante de un polipéptido que puede producirse recombinantemente. La expresión "no natural" puede referirse a las secuencias de los nucleótidos individuales o a la combinación de elementos funcionales utilizados, lo que no se encuentra limitado a promotor, región 3' no traducida, intensificador u origen de replicación. El ácido nucleico puede construirse a partir de fragmentos de ácidos nucleicos, preferentemente fragmentos de ADN, aislados o sintetizados por medios químicos. El ácido nucleico puede integrarse en otro ácido nucleico, por ejemplo en un plásmido o en el genoma/cromosoma de una célula huésped eucariótica. El plásmido incluye, entre otros, vectores lanzadera y de expresión. Típicamente, un plásmido comprende además una unidad de propagación procariótica que comprende un origen de replicación(por ejemplo el origen de replicación ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo el gen de resistencia a ampicilina o a tetraciclina), para la replicación y la selección, respectivamente, del vector en bacterias.

50

55

De manera similar, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos que consiste de nucleótidos individuales.

La expresión "secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a secuencias de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos y variantes de la misma, que codifican un péptido, polipéptido o proteína o una variante funcional de los mismos, es decir, por ejemplo, proteínas con diferentes secuencias de aminoácidos pero que presentan la misma funcionalidad/actividad biológica. Estas modificaciones se deben, por ejemplo, a la degeneración del código genético, a mutaciones, tales como mutaciones puntuales, deleciones,

60

- 5 inserciones y similares. Una variante de una proteína difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de una proteína parental en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia de la proteína parental. Habitualmente, una variante presentará una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 90% respecto a la secuencia de la proteína parental, más preferentemente de por lo menos 95%, y todavía más preferentemente de por lo menos 99%.
- Un "casete de expresión" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende los elementos necesarios para la expresión y secreción de por lo menos el gen estructural contenido en una célula.
- 10 Un "gen" se refiere a un segmento, por ejemplo en un cromosoma o en un plásmido, que resulta necesario para la expresión de un péptido, polipéptido o proteína. Aparte de la región codificante, el gen comprende otros elementos funcionales, incluyendo un promotor, intrones y terminadores.
- 15 Un "gen estructural" se refiere a la región codificante de un gen sin una secuencia de señal.
- El término "promotor" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos reguladora que se utiliza para impulsar la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos posterior en la cadena. La secuencia del promotor puede seleccionarse de entre el grupo que comprende las secuencias de promotor del citomegalovirus (CMV), del virus 40 del simio temprano y tardío (Bemoist C. y Chambon P., *Nature* 290:304-10, 1981); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (VSR) (Yamamoto *et al.*, *Cell* 22:787-97, 1980), la glicerina aldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH), LTR retrovíricos, factor 1 alfa de alargamiento (EF-1 alfa), ubiquitina, timidina quinasa del virus del herpes simplex (HSVTK) (ver también, por ejemplo, Lee A. *et al.*, *Mol. Cell.* 7:495-501, 1997; Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-45, 1981) y las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster *et al.*, *Nature* 296:39-42, 1982) y similares.
- 20 Resultan preferentes los promotores fuertes, tales como los promotores adenovíricos (por ejemplo el promotor tardío mayor adenovírico), el promotor de albúmina, el promotor ApoA1, el promotor beta-actina, los promotores de choque térmico, los promotores heterólogos (por ejemplo de CMV), los promotores de globina humana y de la hormona del crecimiento, los promotores inducibles (por ejemplo MMT), los promotores de LTR retrovíricos, VSR, así como los promotores de timidina quinasa (por ejemplo el promotor de timidina quinasa de herpes simplex). Resultan especialmente preferentes los promotores víricos fuertes, tales como los promotores adenovíricos, el promotor temprano y tardío inmediato del citomegalovirus (CMV; Boshart *et al.*, *Cell* 41:521-30, 1985), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous de las repeticiones terminales largas (LTR-VSR; Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777-81, 1982).
- 25 La expresión "señal de poliadenilación" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos utilizada para inducir el corte y la poliadenilación de transcritos primarios de un segmento específico de secuencia de ácidos nucleicos. La región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de la región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación derivada de SV40, el gen de la hormona del crecimiento bovina (HCB), genes de inmunoglobulina y el gen de timidina quinasa (tk, por ejemplo la señal de poliadenilación de timidina quinasa de herpes simplex).
- 30 Un "gen de resistencia" o un "marcador de selección", los cuales se utilizan intercambiamente en la presente solicitud, es un gen que permite que las células que portan el gen sean específicamente seleccionadas o excluidas en presencia de un agente de selección correspondiente. Un gen de resistencia positivo útil es un gen de resistencia a antibiótico. Este marcador de selección permite que la célula huésped transformada con el gen sea positivamente seleccionada en presencia del antibiótico correspondiente; una célula huésped no transformada no sería capaz de crecer o de sobrevivir bajo las condiciones de cultivo selectivas. Los marcadores de selección pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores de selección positivos permiten la selección de células que portan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten eliminar selectivamente las células que portan el marcador. Típicamente un marcador de selección confiere resistencia a un fármaco o compensa un defecto metabólico o catabólico en la célula huésped. En las células procarióticas, entre otras, se utilizan con frecuencia genes que confieren resistencia frente a la ampicilina, la tetraciclina, la canamicina o el cloranfenicol. Entre los genes de resistencia útiles con células eucarióticas se incluyen, por ejemplo, los genes de la aminoglucósido fosfotransferasa (APH), tal como la higromicina fosfotransferasa (hyg), la neomicina y G418 APH, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa (tk), la glutamina sintetasa (GS), la asparagina sintetasa, la triptófano sintetasa (indol), la histidinoldeshidrogenasa (histidinol D) y los genes codificantes de resistencia a puomicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, zeocina y ácido micofenólico. Se describen genes de marcador adicionales en los documentos n° WO 92/08796 y n° WO 94/28143.
- 35 Aparte de una selección en presencia de un agente de selección correspondiente, un marcador de selección puede proporcionar además un gen codificante de una molécula normalmente no presente en la célula, por ejemplo proteína fluorescente verde (PFV). Las células que alojan dicho gen codificante de PFV pueden distinguirse

fácilmente de células que no alojan este gen, únicamente mediante la detección de la fluorescencia emitida por la PFV.

5 Los vectores/plásmidos de expresión eucarióticos pueden propagarse en las células procarióticas. Por lo tanto, un vector/plásmido de expresión eucariótico puede portar, y con frecuencia porta, más de un gen de resistencia, es decir, un gen de resistencia utilizable para la selección de procariontes y uno utilizable para la selección de eucariotas.

10 Los "elementos reguladores" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a secuencias de nucleótidos presentes en cis, necesarios para la transcripción y/o traducción del gen estructural codificante de un péptido, polipéptido o proteína de interés. Los elementos reguladores de la transcripción normalmente comprenden un promotor cadena arriba del gen estructural que debe expresarse, sitios de inicio y terminación de transcripción y una secuencia de señal de poliadenilación. La expresión "sitio de inicio transcripcional" se refiere a la base de ácidos nucleicos en el gen correspondiente al primer ácido nucleico incorporado en el transcrito primario, es decir, el precursor de ARNm; el sitio de inicio transcripcional puede solaparse con la secuencia de promotor. La expresión "sitio de terminación transcripcional" se refiere a una secuencia de nucleótidos normalmente representada en el extremo 3' de un gen de interés que debe transcribirse, que provoca que la ARN polimerasa termine la transcripción. La secuencia de señal de poliadenilación, o señal de adición de poliA, proporciona la señal para el corte en un sitio específico en el extremo 3' del ARNm eucariótico y la adición post-transcripcional en el núcleo de una secuencia de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos de adenina (cola poliA) al extremo 3' cortado. La secuencia de señal de poliadenilación puede incluir la secuencia de consenso AATAAA situada aproximadamente 10 a 30 nucleótidos cadena arriba del sitio de corte.

25 Para producir un polipéptido secretado, el gen estructural de interés comprende además un segmento de ADN que codifica una secuencia de señal/péptido líder. La secuencia de señal dirige el péptido, polipéptido o proteína recién sintetizado hacia la membrana del RE y a través de la misma, en donde el polipéptido puede ser enviado para la secreción. La secuencia de señal es escindida por peptidasas de señal durante el paso de la proteína a través de la membrana del RE. Respecto a la función de la secuencia de señal, resulta esencial el reconocimiento por parte de la maquinaria de secreción de la célula huésped. Por lo tanto, la secuencia de señal utilizada debe ser reconocida por las proteínas de la célula huésped y los enzimas de la maquinaria de secreción.

Entre los elementos reguladores de la traducción se incluyen un codón de inicio de traducción (AUG) y un codón de parada (TAA, TAG o TGA). En algunos constructos puede incluirse un sitio interno de entrada ribosómica (IRES).

35 Un "promotor" se refiere a una secuencia polinucleótida que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácidos nucleicos a la que se encuentra unida operablemente. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Los promotores utilizados serán funcionales en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada. Un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una diversidad de diferentes fuentes, son conocidos de la técnica (y se encuentran identificados en bases de datos tales como GenBank) y se encuentran disponibles en forma de polinucleótidos clonados o dentro de los mismos (procedentes de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor se encuentra situado en la región cadena arriba (5') de un gen, próximo al sitio de inicio de transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que actúan para el inicio de la transcripción con frecuencia se caracterizan por secuencias de nucleótidos de consenso. Entre estos elementos promotores se incluyen sitio de unión de ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (EED; McGehee R.E. *et al.*, Mol. Endocrinol. 7:551-60, 1993), elementos de respuesta de AMP cíclico (ERC), elementos de respuesta séricos (ERS; Treisman R., Seminars in Cancer Biol. 1:47-58, 1990), elementos de respuesta de glucocorticoides (ERG) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como ERG/ATF (O'Reilly M.A. *et al.*, J. Biol. Chem. 267:19938-43, 1992), AP2 (Ye J. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25728, 1994), SP1, proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc (PUERC; Loeken M.R., Gene Expr. 3:253-64, 1993) y factores octámeros (ver, en general, Watson *et al.*, editores, Molecular Biology of the Gene, 4a ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987, y Lemaigre F.P. y Rousseau G.G., Biochem. J. 303:1-14, 1994). En el caso de que un promotor sea un promotor inducible, la tasa de transcripción se incrementa en respuesta a un agente inductor. En contraste, la tasa de transcripción no se encuentra regulada por un agente inductor en el caso de que el promotor sea un promotor constitutivo. También son conocidos los promotores reprimibles. Por ejemplo, el promotor c-fos resulta específicamente activado con la unión de hormona de crecimiento a su receptor sobre la superficie celular. Puede conseguirse la expresión regulada por tetraciclina (tet) con promotores híbridos artificiales que consisten, por ejemplo, de un promotor de CMV seguido de dos sitios de operador Tet. El represor Tet se une a los dos sitios de operador Tet y bloquea la transcripción. Tras la adición del inductor tetraciclina, resulta liberado el represor Tet de los sitios de operador Tet y se produce la transcripción (Gossen M. y Bujard H., PNAS 89:5547-5551, 1992). Para otros promotores inducibles, incluyendo la metalotioneína y los promotores de choque térmico, ver, por ejemplo,

Sambrook *et al.* (*supra*) y Gossen M. *et al.*, Curr. Opin. Biotech. 5:516-520, 1994. Entre los promotores eucarióticos que se han identificado como promotores fuertes para la expresión de nivel elevado se encuentran el promotor temprano de SV40, el promotor tardío mayor adenovirico, el promotor metalotioneína-I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor 1-alfa de alargamiento de hámster chino (CHEF-1; ver, por ejemplo, la patente US nº 5.888.809), la EF-1 alfa humana, la ubiquitina y el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV IE).

El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un intensificador (es decir, un elemento de ADN de acción en cis que actúa sobre un promotor, incrementando la transcripción) puede resultar necesario para funcionar conjuntamente con el promotor en el incremento del nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y puede incluirse en forma de un elemento regulador de la transcripción. Con frecuencia, el segmento polinucleótido que contiene el promotor también incluye secuencias de intensificador (por ejemplo CMV o SV40).

Un "intensificador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia polinucleótida que incrementa la transcripción de un gen o secuencia codificante a la que se encuentra unida operablemente. Al contrario que los promotores, los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y de la posición y se han encontrado en posición 5' ó 3' (Lusky M. *et al.*, Mol. Cell Bio. 3:1108-22, 1983) respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji J. *et al.*, Cell 33:729-40, 1983), así como dentro de la secuencia codificante misma (Osborne T.F. *et al.*, Mol. Cell Bio., 4:1293-305, 1984). Por lo tanto, pueden introducirse intensificadores cadena arriba o abajo del sitio de inicio de transcripción o a distancias considerables del promotor, aunque en la práctica los intensificadores pueden solaparse física y funcionalmente con promotores. Un gran número de intensificadores, de una diversidad de diferentes fuentes, son bien conocidos de la técnica (y se encuentran identificados en bases de datos tales como GenBank) y se encuentran disponibles en forma de polinucleótidos clonados o dentro de los mismos (procedentes de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Varios polinucleótidos que comprenden secuencias de promotor (tales como el promotor de CMV utilizado comúnmente) también comprenden secuencias de intensificador. Por ejemplo, la totalidad de los promotores fuertes listados anteriormente también pueden contener intensificadores fuertes (ver, por ejemplo, Bendig M.M., Genetic Engineering 7:91-127, 1988).

La expresión "operablemente unido" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes descritos de esta manera se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o un intensificador se encuentran ligados operablemente a una secuencia codificante en el caso de que actúen en cis en el control o modulación de la transcripción de la secuencia ligada. Generalmente, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que se encuentran "operablemente ligados" son contiguas y, en caso de que se requieran para unir dos regiones codificantes de proteína, tales como un líder secretorio y un polipéptido, son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, aunque un promotor operablemente ligado generalmente se encuentra situado cadena arriba de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo a la misma. Los intensificadores no son necesariamente contiguos. Un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que el intensificador incremente la transcripción de la secuencia codificante. Los intensificadores operablemente ligados pueden encontrarse situados cadena arriba, dentro o cadena abajo de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante/gen estructural en el caso de que se encuentre situado en el extremo de cadena abajo de la secuencia codificante de manera que la transcripción se produce por la secuencia codificante hasta entrar en la secuencia de poliadenilación. El ligamiento se consigue mediante métodos recombinantes conocidos de la técnica, por ejemplo utilizando metodología de PCR y/o ligación en sitios de restricción convenientes. En el caso de que no existan sitios de restricción convenientes, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o linkers según la práctica convencional.

El término "expresión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la transcripción y/o traducción que se produce dentro de una célula huésped. El nivel de transcripción de un producto deseado en una célula huésped puede determinarse a partir de la cantidad de ARNm correspondiente que se encuentra presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse mediante PCR o mediante hibridación northern (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada pueden cuantificarse mediante diversos métodos, por ejemplo mediante ELISA, mediante el ensayo de la actividad biológica de la proteína, o mediante la utilización de ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como la transferencia western o el radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína (ver Sambrook *et al.*, *supra*, 1989).

Una "célula huésped" se refiere a una célula en la que se introduce el gen codificante del polipéptido de la invención. La célula huésped incluye tanto células procarióticas utilizadas para la propagación de los plásmidos/vectores, como células eucarióticas para la expresión del gen estructural. Típicamente las células eucarióticas son células de mamífero.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos".

5 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas en las que por lo menos una cadena presenta una longitud de aminoácidos de 100 ó más. Una proteína puede comprender además componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a una proteína, y pueden variar según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras esqueléticas de aminoácidos; algunas adiciones tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, aunque pueden encontrarse presentes de todos modos.

15 La expresión "ADN heterólogo" o "polipéptido heterólogo" se refiere a una molécula de ADN o un polipéptido, o a una población de moléculas de ADN o a una población de polipéptidos, que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas respecto a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno), con la condición de que dicho ADN del huésped se combine con ADN que no es del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN que no es del huésped codificante de un polipéptido ligado operablemente a un segmento de ADN que comprende un promotor se considera que es una molécula de ADN heteróloga.

A la inversa, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen estructural endógeno operablemente ligado a un promotor exógeno.

25 Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN que no es del huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

30 Los términos "plásmido" y "vector" tal como se utilizan en la presente solicitud se refieren a un vehículo para la transferencia de material genético al interior de las células. Este material es generalmente, aunque no exclusivamente, una molécula circular de ácidos nucleicos. Según el propósito pretendido del plásmido, puede contener además un origen de replicación con los segmentos de control de la replicación necesarios, por ejemplo para permitir la replicación o la transcripción del plásmido en el huésped.

35 Un "vector de clonación" es una molécula de ácidos nucleicos, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o cromosoma artificial bacteriano (CAB), que presenta la capacidad de replicar autónomamente en una célula huésped. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un número reducido de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácidos nucleicos de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos codificantes de un gen de resistencia que resulta adecuado para la utilización en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Entre los genes de resistencia típicamente se incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

45 Un "plásmido de expresión" es una molécula de ácidos nucleicos codificante de una proteína que debe expresarse en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad procariótica de propagación plasmídica (por ejemplo, para E. coli, que comprende un origen de replicación y un marcador de selección), un marcador de selección eucariótico y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés. Un "casete de expresión" comprende típicamente un promotor, una región 5' no traducida, un gen estructural y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación. La expresión génica habitualmente se encuentra bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen estructural se encuentra "operablemente ligado" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor nuclear se encuentran operablemente ligados en el caso de que el elemento regulador module la actividad del promotor nuclear.

55 Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que se encuentra esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas al polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, una pureza de por lo menos aproximadamente 80%, una pureza de por lo menos aproximadamente 90%, una pureza de por lo menos aproximadamente 95%, una pureza superior al 95%, o una pureza superior al 99%. Una manera de demostrar que una preparación particular de proteína contiene un polipéptido aislado es a partir de la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteínas y la tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros, en forma mutada, tal como con mutación puntual, o formas alternativamente glucosiladas o derivatizadas.

- 5 El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como cadenas sencillas (scFv) (por ejemplo Huston J.S. *et al.*, PNAS USA 85:5879-5883, 1988; Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988, y, en general, Hood L. E., Weissman I., Wood W. B. y Wilson J. H., Immunology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, 1983, y Hunkapiller y Hood, Nature 323:15-16, 1986).
- 10 Una inmunoglobulina en general comprende por lo menos dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera puede contener una región variable (generalmente la parte amino-terminal de la cadena polipeptídica), que contiene un dominio de unión que es capaz de interactuar con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas cadena y pesada comprende una región constante (generalmente la parte carboxilo-terminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) con células que portan un receptor de Fc gamma (FcγR), tal como células fagocíticas, o ii) con células que portan el receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor de Brambell. También media en la unión de algunos factores, incluyendo factores del sistema clásico del complemento, tal como el componente (C1q).
- 15 El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina a su vez comprende diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).
- 20 Un "fragmento de inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido que comprende uno o más segmentos seleccionados de entre el grupo que consiste de dominio C_H1, región bisagra, dominio C_H2, dominio C_H3, dominio C_H4, dominio C_L, dominio V_H, dominio V_L, región de marco 1, región de marco 2, región de marco 3, región de marco 4, región hipervariable 1, región hipervariable 2 y región hipervariable 3, con o sin inserciones, deleciones y/o mutaciones.
- 25 La expresión "una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación" tal como se indica en la presente solicitud es una secuencia de ADN de 50 a 750 pares de bases de longitud que proporciona la señal para el corte en un sitio específico en el extremo 3' del ARNm eucariótico y la adición post-transcripcional de una secuencia de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos de adenina (cola poliA) al extremo 3' cortado en el núcleo. Son recomendables señales de poliadenilación muy eficientes debido a que un corte y poliadenilación ineficientes pueden conducir a la formación de un ARNm de tipo operón que puede ser el motivo de una expresión génica no deseada, por ejemplo codificada en un plásmido.
- 30 Los términos "huésped" y "célula" tal como se utilizan en la presente solicitud se refieren a una célula que resulta adecuada para recibir plásmidos según la presente invención. Preferentemente la célula se selecciona de entre el grupo que comprende las células CHO (de ovario de hámster chino), BHK (renales de hámster neonato) y otras células de roedor. Resultan preferentes las células CHO o las células CHO derivadas que comprenden células CHO-K1, células CHO-DXB11, células CHO-DG44 y las células CHO que expresan la proteína EBNA-1. La progenie de la célula proporcionada según la invención también se encuentra incluida. También se encuentra incluida la progenie de la célula proporcionada según la presente invención con modificaciones en generaciones consecutivas que pueden surgir debido a mutación, influencias medioambientales o la degeneración del código genético. La expresión "línea celular" se refiere especialmente a una población de células que pueden propagarse *in vitro* durante un periodo de tiempo especificado. Durante este periodo, las células crecen y proliferan mediante división celular.
- 35 La expresión "transfección transitoria" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un procedimiento en el que el ácido nucleico introducido en una célula no se integra en el genoma o ADN cromosómico de esa célula. De hecho se mantiene en forma de un elemento extracromosómico, por ejemplo como un episoma, dentro de la célula. Los procesos de transcripción del ácido nucleico del episoma no resultan afectados y, por ejemplo, se produce una proteína codificada por el ácido nucleico del episoma.
- 40 La expresión "transformado establemente" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la integración heredable y estable de ácido nucleico exógeno en el genoma/cromosoma de una célula huésped.
- 45 La expresión "polipéptido biológicamente activo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula orgánica, por ejemplo una macromolécula biológica, tal como un péptido, proteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintético, que provoca un efecto biológico al administrarlo en sistemas biológicos artificiales, tales como bioensayos utilizando líneas celulares y virus, o *in vivo* en un animal, incluyendo, aunque sin limitación, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Este efecto biológico puede ser, aunque sin limitación, la inhibición enzimática, la activación o modificación alostérica, la unión a un receptor, en el sitio de unión o en un sitio próximo, el bloqueo o activación de un receptor, la inducción de una señal o la unión a antígeno.
- 50 La expresión "polipéptido biológicamente activo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula orgánica, por ejemplo una macromolécula biológica, tal como un péptido, proteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintético, que provoca un efecto biológico al administrarlo en sistemas biológicos artificiales, tales como bioensayos utilizando líneas celulares y virus, o *in vivo* en un animal, incluyendo, aunque sin limitación, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Este efecto biológico puede ser, aunque sin limitación, la inhibición enzimática, la activación o modificación alostérica, la unión a un receptor, en el sitio de unión o en un sitio próximo, el bloqueo o activación de un receptor, la inducción de una señal o la unión a antígeno.
- 55 La expresión "polipéptido biológicamente activo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula orgánica, por ejemplo una macromolécula biológica, tal como un péptido, proteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintético, que provoca un efecto biológico al administrarlo en sistemas biológicos artificiales, tales como bioensayos utilizando líneas celulares y virus, o *in vivo* en un animal, incluyendo, aunque sin limitación, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Este efecto biológico puede ser, aunque sin limitación, la inhibición enzimática, la activación o modificación alostérica, la unión a un receptor, en el sitio de unión o en un sitio próximo, el bloqueo o activación de un receptor, la inducción de una señal o la unión a antígeno.
- 60 La expresión "polipéptido biológicamente activo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula orgánica, por ejemplo una macromolécula biológica, tal como un péptido, proteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintético, que provoca un efecto biológico al administrarlo en sistemas biológicos artificiales, tales como bioensayos utilizando líneas celulares y virus, o *in vivo* en un animal, incluyendo, aunque sin limitación, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Este efecto biológico puede ser, aunque sin limitación, la inhibición enzimática, la activación o modificación alostérica, la unión a un receptor, en el sitio de unión o en un sitio próximo, el bloqueo o activación de un receptor, la inducción de una señal o la unión a antígeno.

Las secuencias de ácidos nucleicos del origen de replicación oriP del VEB, el elemento bivalente simétrico del VEB y la familia del VEB de repeticiones se indican en SEC ID n° 01 a SEC ID n° 03, que han sido derivadas de GenBank,

entrada nº V01555. La secuencia codificante de la proteína EBNA-1 se indica en SEC ID nº 04 como secuencia de ácidos nucleicos y en SEC ID nº 05 como secuencia de aminoácidos. Estas secuencias han sido derivadas de V01555 (GenBank) y P03211 (SwissProt), respectivamente.

5 Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefariosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998).

15 La presente invención proporciona un método para la expresión de péptidos, polipéptidos y proteínas diana en células CHO. La presente invención proporciona además una célula CHO para la producción de un péptido, polipéptido o proteína heterólogo, en la que el gen estructural codificante del péptido, polipéptido o proteína heterólogo es proporcionado por un episoma dentro de la célula CHO. Los polipéptidos o proteínas compuestos de dos o más subunidades, es decir, por ejemplo, las inmunoglobulinas, pueden producirse igualmente bien siguiendo el método de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de una inmunoglobulina, que está compuesta de dos parejas de una cadena ligera y una cadena pesada, puede utilizarse un episoma que contiene dos genes estructurales codificantes de ambas cadenas de la inmunoglobulina. Alternativamente pueden utilizarse dos episomas, por ejemplo uno que contiene el gen estructural codificante de la cadena ligera y uno que contiene el gen estructural codificante de la cadena pesada.

25 En la presente invención se utiliza un promotor que se dirige a la expresión de la proteína EBNA-1. Preferentemente se utiliza un promotor fuerte, preferentemente un promotor fuerte heterólogo, tal como, por ejemplo, del CMV. La integración estable de un casete de expresión para la proteína EBNA-1 en el ADN cromosómico resultó en una célula de roedor modificada que expresaba la proteína EBNA-1, es decir, el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 y el promotor se integran operablemente ligados en el ADN cromosómico.

35 A fin de ilustrar la materia objeto de la presente invención a continuación se describe la invención. Como primera etapa se construye una línea celular de roedor básica que expresa la proteína EBNA-1. Preferentemente se construye una línea celular de roedor básica, que en cultivo expresa establemente la proteína EBNA-1. A continuación se diseña y se introduce en la línea celular de roedor básica un plásmido, que contiene un casete de expresión para uno o más polipéptidos heterólogos. La línea celular obtenida, que expresan la proteína EBNA-1 y que porta el plásmido o plásmidos para la expresión de uno o más polipéptidos heterólogos, se cultiva bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido o polipéptidos heterólogos (ver los Ejemplos 1 a 4).

40 La descripción y ejemplos, posteriormente, se proporcionan a título ilustrativo de la invención y no limitativo del alcance de la invención.

Construcción de la línea celular huésped

45 La célula huésped de la presente invención proporciona un ácido nucleico codificante de la proteína EBNA-1.

La construcción de un plásmido que contiene un casete de expresión con el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se describe en el Ejemplo 2a). En la figura 1 se muestra un mapa anotado del plásmido.

50 Se transfectaron con este plásmido células de roedor. Tras la selección de las células transfectadas bajo condiciones de cultivo selectivas con G418 como agente selectivo, se recolectaron los transformantes, se expandieron y se sometieron a ensayo para la producción de proteína EBNA-1.

55 El plásmido construido para la formación de la línea celular de roedor básica no contendrá una copia funcional de la secuencia oriP del VEB. Ello incluye ambos elementos del oriP, el elemento bivalente simétrico y la familia de repeticiones.

Construcción de plásmidos de expresión

60 Para la expresión de un péptido, polipéptido o proteína heterólogo, deben construirse plásmidos de expresión que contienen casetes de expresión para los genes estructurales correspondientes.

A título de ejemplo de proteína, se seleccionó el anticuerpo humano monoclonal anti-IGF-1R (ver el documento nº US 2005/0008642). Para la producción del mAb_hu anti-IGF-1R, utilizando la línea celular de roedor básica de la invención, se construyeron plásmidos de expresión (ver el Ejemplo 3 y las figuras 3 a 5). Los plásmidos construidos para la expresión del polipéptido heterólogo no deben contener una copia funcional del gen estructural de EBNA-1.

En general, los genes estructurales codificantes de la región variable de cadena ligera (V_L) del mAb_hu anti-IGF-1R y la región constante de cadena ligera κ humana (C_L) se unieron al igual que los genes estructurales para la región variable de cadena pesada (V_H) del mAb_hu anti-IGF-1R y la región constante de cadena pesada $\gamma 1$ humana (C_H1 -bisagra- C_H2 - C_H3) mediante subclonación y PCR solapante. Estos constructos posteriormente se insertaron en vectores de expresión de células de mamífero que no presentaban o que portaban oriP del VEB.

Expresión de los polipéptidos en la línea celular de roedor básica

La línea celular de roedor básica según la invención se transfectó con uno o más de los plásmidos de expresión construidos. El cultivo de las células transfectadas se llevó a cabo bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido o polipéptidos heterólogos, por ejemplo bajo transfección transitoria.

En general, el cultivo bajo transfección transitoria permite que el plásmido o plásmidos de expresión transfectados no se integren en el cromosoma de la célula huésped debido a la ausencia de una presión selectiva ejercida por un agente de selección. Debido a estas condiciones de crecimiento no selectivas, los plásmidos de expresión no se replican en todas las células del cultivo a una frecuencia de 100%. Ello provoca un lento declive de la tasa global de expresión de proteínas. El cultivo se lleva a cabo generalmente hasta que la concentración de la proteína expresada en el cultivo alcanza un valor máximo. Preferentemente, el cultivo se lleva a cabo durante un máximo de veinte días, preferentemente durante un máximo de diez días, más preferentemente durante cinco a diez días.

Tras este periodo de tiempo, se separó el sobrenadante y la inmunoglobulina secretada que se produjo se aisló y se purificó según técnicas estándares conocidas por el experto en la materia.

Aparte del cultivo por lotes tal como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse un procedimiento de lotes partidos para el cultivo de las células. En el procedimiento de cultivo de lotes partidos, el medio nutritivo se intercambia tras transcurrir la mitad del periodo de cultivo.

De esta manera, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la expresión de un polipéptido heterólogo que permite producir en un tiempo corto dicho polipéptido heterólogo con un patrón de glucosilación similar al de las células de mamífero, preferentemente de las células humanas. Ahora inesperadamente se ha encontrado que un método según la presente invención satisface esta necesidad.

La línea celular en la que se basa dicho método es una célula de roedor, preferentemente una células CHO, que cumple las regulaciones dictadas para las líneas celulares destinadas a la producción de polipéptidos y proteínas terapéuticos, es decir, no contiene pro-oncogenes tales como el antígeno T grande del virus del poliovirus.

Inesperadamente se ha encontrado que en una célula establemente transfectada con un gen estructural codificante de la proteína EBNA-1, preferentemente ligada operablemente con un promotor, en la expresión de polipéptidos heterólogos resultan funcionales elementos extracromosómicos, por ejemplo plásmidos de expresión, que presentan un origen de replicación de virus de Epstein-Barr (VEB) y sin, es decir que no contienen, un gen estructural codificante de la proteína EBNA-1. Generalmente, en un método según la invención resultan de utilidad dos elementos derivados del virus de Epstein-Barr: el origen de replicación (oriP) y el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1.

Un aspecto de la presente invención es un método para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula CHO, caracterizado porque dicho método comprende:

- a) proporcionar una célula CHO establemente transfectada con el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 y que no contiene el antígeno T grande del virus del poliovirus, en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente ligado a un promotor fuerte y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB,
- b) transfectar dicha célula CHO con un plásmido de expresión que comprende:
 - (i) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como único elemento derivado del VEB,
 - (ii) ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1,
 - (iii) un origen de replicación procariótico,
 - (iv) un marcador de selección,
 - (v) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una

secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicha proteína heteróloga y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación,

c) cultivar dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido heterólogo,

5 d) recuperar dicho polipéptido heterólogo a partir del cultivo.

En una realización, dicho polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina, preferentemente dicha inmunoglobulina es una inmunoglobulina G o una inmunoglobulina E.

10 En una realización, dicho polipéptido heterólogo es un polipéptido heterólogo secretado y dicho polipéptido heterólogo se recupera del medio de cultivo.

En una realización, dicho gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente ligado a un promotor, preferentemente un promotor fuerte, especialmente preferentemente al promotor derivado del CMV.

15 En una realización, dicho plásmido de expresión comprende como único elemento derivado del VEB, un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB).

20 En una realización, dicho plásmido de expresión no comprende ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1.

En una realización, en el caso de que el polipéptido heterólogo sea un polipéptido heterólogo secretado, dicho casete de expresión comprende además una secuencia de señal ligada operablemente al gen estructural codificante de dicho polipéptido heterólogo.

25 En una realización, el método para la expresión de un polipéptido heterólogo se lleva a cabo como procedimiento por lotes, como procedimiento en lotes partidos o como procedimiento continuo. En una realización preferente, dicho método se lleva a cabo como procedimiento por lotes o en lotes partidos.

30 En una realización, el método para la expresión de un polipéptido heterólogo contiene además una etapa e) de purificación de dicho polipéptido heterólogo.

Los métodos cromatográficos generales y su utilización son conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, Chromatography, 5a edición, parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed.), Elsevier Science Publishing Company, New York, 1992; Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 1998; Chromatography Today, Poole, C. F., and Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, 1991, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 1982; Sambrook J. *et al.* (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. *et al.* (editores), John Wiley & Sons, Inc., New York.

El procedimiento de purificación de inmunoglobulinas en general comprende una parte cromatográfica multietapa. En la primera etapa, se separan polipéptidos y proteínas no inmunoglobulinas de la fracción de inmunoglobulinas mediante una cromatografía de afinidad, por ejemplo con proteína A. A continuación puede llevarse a cabo una cromatografía de intercambio iónico para separar las clases individuales de inmunoglobulina y para eliminar las trazas de proteína A, que ha sido coeluida de la primera columna. Finalmente resulta necesaria una tercera etapa cromatográfica para separar los monómeros de inmunoglobulina de los multímeros y los fragmentos de la misma clase. En ocasiones la cantidad de agregados es elevada (5% o más) y no resulta posible separarlos eficientemente en la tercera etapa de purificación, requiriendo etapas de purificación adicionales.

50 Con la producción recombinante de inmunoglobulinas específicas, puede omitirse la etapa de separación para la separación de las diferentes clases de inmunoglobulina. De esta manera, el procedimiento global de purificación de inmunoglobulinas producidas recombinantemente puede reducirse a dos etapas cromatográficas.

55 El eluido de proteína A en general se procesa cromatográficamente en un material de intercambio catiónico a valores de pH inferiores al punto isoeléctrico de la proteína inmunoglobulina respectiva.

En una realización, el método para la expresión de un polipéptido heterólogo se lleva a cabo mediante transfección transitoria.

60 En una realización de dicho método para la expresión de un polipéptido heterólogo, dicho gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 es un gen estructural de longitud completa (SEC ID nº 4) codificante de la proteína EBNA-1 y

dicho plásmido de expresión no comprende ningún gen estructural de longitud completa (SEC ID nº 4) codificante de la proteína EBNA-1.

5 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

- 10 Figura 1 Mapa del plásmido pcDNA3_EBNA-1; plásmido que contiene el casete de expresión para la proteína EBNA-1.
- Figura 2 Análisis de transferencia western de la expresión de EBNA-1. Leyenda de la figura 2a): carril 1: EBNA de 293, 65 mg de proteína; carril 2: CHO-DG44, 100 mg de proteína; carril 3: DG-700-IIH7, 100 mg de proteína; carril 4: DG-700-IIID9, 100 mg de proteína; carril 5: DG-700-IIIE3, 100 mg de proteína; carril 6: DG-700-IIIEB, 100 mg de proteína; carril 7: DG-700-IIIF1, 100 mg de proteína; carril 8: DG-700-IIIG10, 100 mg de proteína; carril 9: DG-700-IIHIB, 100 mg de proteína. Leyenda de la figura 2a): carril 1: Estándar de proteína; carril 2: EBNA de 293, 100 mg de proteína; carril 3: DG-700-IIIE3sub1, 4º pase, día 6, 100 mg de proteína; carril 4: DG-700-IIIE3sub1, 15º pase, día 37, 100 mg de proteína; carril 5: DG-700-IIIE3sub1, 18º pase, día 48, 100 mg de proteína; carril 6: DG-700-IIIE3sub1, 20º pase, día 54, 100 mg de proteína.
- Figura 3a Mapa del plásmido p4816-pUC-L-IR18-kappa BsmI
- Figura 3b Mapa del plásmido p4817-pUC-H-IR18-gamma1 BsmI
- Figura 4a Mapa del plásmido p4818-pUC-Hyg-OriP-pesada-IR18-BsmI
- Figura 4b Mapa del plásmido p4819-pUC-Hyg-OriP-ligera-IR18-BsmI
- Figura 5 Mapa del plásmido p4821-pUC-Hyg-OriP-IR18-pesada-ligera-BsmI
- Figura 6 Comparación entre la expresión del anticuerpo en diferentes líneas celulares y con diferentes plásmidos de expresión

Descripción de las secuencias

- 15 SEC ID nº 01 Secuencia de ácidos nucleicos del oriP del VEB; V01555 (GenBank); Yates J.L. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81:3806-3806, 1984.
- SEC ID nº 02 Secuencia de ácidos nucleicos del elemento bivalente simétrico del VEB; V01555 (GenBank); Reisman D. *et al.*, Mol. Cell Biol. 5:1822-1832, 1985.
- SEC ID nº 03 Secuencia de ácidos nucleicos de la familia de repeticiones del VEB; V01555 (GenBank); Reisman *et al.*, 1985.
- 20 SEC ID nº 04 Secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína EBNA-1; V01555 (GenBank).
- SEC ID nº 05 Secuencia de aminoácidos de la proteína EBNA-1; P03211 (SwissProt).
- SEC ID nº 06 Oligonucleótido cebador 1.
- SEC ID nº 07 Oligonucleótido cebador 2.
- SEC ID nº 08 Oligonucleótido cebador 3.
- 25 SEC ID nº 09 Oligonucleótido cebador 4.

Descripción de los Ejemplos

- Ejemplo 1 Técnicas generales.
- 30 Ejemplo 2 Construcción de las líneas celulares de CHO que expresan la proteína EBNA-1.
- Ejemplo 3 Construcción de plásmidos que portan oriP del VEB y casetes de expresión para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humano anti-IGF-1R.
- Ejemplo 4 Producción de anticuerpos por células DG-700-IIIE3sub1 positivas para EBNA-1 a partir de plásmidos portadores de oriP.
- 35

Ejemplo 1

Técnicas generales

40 **a) Técnicas de ADN recombinante**

Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tal como se describe en Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T., Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

45

b) Determinación de la secuencia de ADN

Se determinaron las secuencias de ADN mediante secuenciación de doble cadena realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania).

5 **c) Análisis de secuencias de ADN y de proteínas y gestión de los datos de secuencias**

Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI Advance suite versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

10 **d) Técnicas de cultivo celular**

Se utilizaron técnicas estándares de cultivo celular tales como las descritas en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M. (editores), John Wiley & Sons, Inc., 2000.

15 **e) Análisis de transferencia western de la expresión de EBNA-1**

20 Se recolectaron las células mediante centrifugación a 200xg, se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron en tampón de lisis (Tris*HCl 50 mM (hidrocloruro de tris(hidroximetil)amino-metano), pH 8,0, NaCl 120 mM, Nonidet[®] P40 al 0,5% (v/v), glicerol al 10% (v/v), DTT (ditiotretitol) 5 mM, EGTA (ácido etilén-bis(oxitilenonitrilo)tetraacético), Trasylol[®] al 1% (v/v), PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) 2 mM, leupeptina 50 mg/ml) durante 30 minutos sobre hielo. Tras la centrifugación a 13.000xg, se recolectó el sobrenadante soluble y se sometió a ensayo para la concentración de proteínas utilizando un ensayo de proteínas de Bio-Rad (nº de cat. 5000-0001) siguiendo el protocolo del fabricante.

25 Se llevaron a cabo la electroforesis en gel de SDS/poliacrilamida (dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE) y la electrotransferencia de proteínas utilizando el sistema de gel NuPAGE[®] (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agrupó el lisado de proteínas (100 mg de proteínas) con el volumen de 4 veces de tampón para muestras LDS reductor (dodecilsulfato de litio), incubado a 70°C durante 10 minutos y se cargó en geles Bis/Tris NuPAGE[®] Novex al 10% (Invitrogen, nº de cat. NP0301). La separación de las proteínas se realizó en tampón de migración reductor MES SDS NuPAGE[®] (ácido 4-morfolinoetanosulfónico/dodecilsulfato sódico). Para la electrotransferencia de proteínas a partir de los geles de SDS/poliacrilamida, se utilizaron membranas de nilón estándares. Tras la electrotransferencia, las membranas se lavaron en Tris*HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM (TBS, solución salina tamponada con Tris) y los sitios de unión no específica se bloquearon durante la noche a 4°C en TBS, reactivo de bloqueo western al 1% (p/v) (Roche, nº de cat. 11921673001). Se utilizó anticuerpo monoclonal de ratón E8.26 (Oncogene, nº de cat. DP15L) dirigido contra EBNA1 como anticuerpo primario a una dilución de 1:1.000 en TBS, solución de bloqueo western al 1% (p/v). Tras dos lavados en TBS y dos lavados en TBS suplementado con Tween-20 (TBST) al 0,05% (v/v), se utilizó un anticuerpo IgG anti-ratón/anti-conejo acoplado con peroxidasa (Roche, nº de cat. 1520709) como anticuerpo secundario a una dilución de 1:10.000 en TBS con solución de bloqueo western al 1% (p/v). Tras dos lavados con TBST y tres lavados con TBS, se detectaron los conjugados con peroxidasa unida mediante quimioluminiscencia utilizando solución de sustrato LumiLightPlus (Roche, nº de cat. 12015196001) y analizador Lumi-Imager F1 (Roche Molecular Biochemicals).

45 **f) Cuantificación de anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de cultivo celular**

50 Se cuantificaron los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo celular mediante un inmunoensayo competitivo utilizando el kit de detección de Fc humano (Cis Bio, nº de cat. 62HFCPEB). El ensayo se basa en la tecnología HTRF[®] (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo). Brevemente, se diluyeron muestras 1:10 a 1:100 en tampón diluyente. Se agruparon 50 ml de muestra diluida con 25 ml de anti-IgG humano Fc-criptato y 25 ml de IgG humano-XL665 en placas OptiPlates de 96 pocillos (Perkin Elmer, nº de cat. 6005279). Se incubaron mezclas de ensayo durante la noche a temperatura ambiente. Tras la excitación a 320 nm, se midió la emisión fluorescente a 620 nm y a 665 nm utilizando un analizador Victor 1420 (Perkin-Elmer). Se dedujeron las concentraciones de anticuerpos a partir de la proporción 665 nm/620 nm mediante la comparación con una curva de calibración.

55 **Ejemplo 2**

Construcción de las líneas celulares de CHO que expresan la proteína EBNA-1

60 **a) Construcción del plásmido pcDNA3_EBNA-1 para la expresión de la proteína EBNA-1 en células CHO**

Se cortó el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen, nº de cat. V79020) con las nucleasas de restricción SacI y DraIII y el fragmento resultante de 4.715 pb se ligó con un conector de ADN obtenido mediante la hibridación del oligonucleótido 1 (SEC ID nº 06) y el oligonucleótido 2 (SEC ID nº 07). El plásmido resultante se cortó con HindIII y

Dralll. El fragmento vector de 4.748 pb se ligó con un fragmento de ADNc HindIII/Dralll codificante de EBNA-1 obtenido mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando pCEP4 (Invitrogen, nº de cat. V044-50) como molde y los oligonucleótidos 3 (SEC ID nº 08) y 4 (SEC ID nº 09) como cebadores. El plásmido de expresión eucariótico para EBNA-1 se denominó pcDNA3_EBNA-1 (figura 1).

b) Transfección de células CHO con pcDNA3_EBNA-1 y selección de transfectantes estables

Se mantuvieron en matraces de agitación en medio DHI células CHO-DG44 preadaptados al cultivo en suspensión sin suero (Schlaeger E.J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996) en un incubador humidificado a 37°C con pCO₂ de 5%.

Previamente a la transfección se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de 1x10⁶ células/ml. La transfección se llevó a cabo utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, nº de cat. 11668-027) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se diluyó ADN y lipofectamina 2000 en medio OptiMEM-1 (Invitrogen, nº de cat. 31985-047) y se combinaron en una proporción de mg de ADN a ml de lipofectamina 2000 de 1:3 a 1:6. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la mezcla a las células. Tras 24 horas, las células se diluyeron en medio DHI y se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 300 células/pocillo. Tras 24 horas adicionales, se añadió G418 al medio a una concentración de 700 mg/ml. Diez días después de la transfección, se expandieron las colonias resistentes a G418 y se analizaron para la expresión de la proteína EBNA-1 mediante hibridación de inmunotransferencia western (figura 2a). Como referencias se utilizaron células HEK293 que expresaban establemente la proteína EBNA-1 (HEK 293 EBNA o HEK 293 E) y células CHO-DG44 no transfectadas. El clon DB-700-III-E3 era fuertemente positiva para EBNA-1 y se subclonó mediante dilución limitante. El subclón DG-700-III-E3sub1 positivo para EBNA-1 se cultivó continuamente y se comprobó para la expresión de EBNA-1 mediante hibridación de inmunotransferencia western (figura 2b). Tal como se muestra en la figura 2b, el nivel de proteína EBNA-1 no cambió durante los 54 días de cultivo.

Ejemplo 3

Construcción de plásmidos que portan oriP del VEB y casetes de expresión para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humano anti-IGF-1R

En general, los segmentos génicos codificantes de la región variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo anti-IGF-1R y la región constante (C_L) de cadena ligera κ humana se unieron al igual que los genes estructurales para la región variable de cadena pesada (V_H) del anticuerpo anti-IGF-1R y la región constante de cadena pesada γ1 humana (C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}) mediante subclonación y PCR solapante. Las secuencias de ADN codificantes de los genes estructurales del anticuerpo anti-IGF-1R (cadena ligera κ y cadena pesada γ1) se confirmaron mediante secuenciación del ADN y posteriormente se insertaron en vectores de expresión de células de mamífero que no presentaban o que portaban oriP del VEB. El vector de expresión p4816-pUC-L-IR-18-kappa-BsmI (p4816) de la cadena ligera κ del mAb_hu anti-IR18 está compuesto de los elementos siguientes:

- origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* (ori de pUC),
- un gen β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli* (Amp),
- una unidad transcripcional para la expresión de la cadena ligera κ del anticuerpo anti-IGF-1R compuesto de los elementos siguientes:
 - el promotor inmediato-temprano mayor e intensificador del citomegalovirus humano (CMV_h IE1),
 - un 5'-UTR sintético que incluye una secuencia de Kozak, - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal (L1_Intrón_L2),
 - el ADNc de cadena ligera variable del anticuerpo anti-IGF-1R clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donador de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3' (V_L),
 - la región constante del gen de cadena ligera kappa humana genómico, incluyendo el intensificador de Ig-kappa de ratón intrónico [NotI_Ig-kappa de ratón-intensificador-intrón-2_intrón-2 humano_C-kappa],
 - el 3' UTR de inmunoglobulina kappa humana, incluyendo la secuencia de señal de poliadenilación (3' UTR C-kappa),
 - los sitios de restricción únicos Sse8371I y FseI en los extremo 5' y 3', respectivamente, para permitir la transferencia del casete de expresión a plásmidos de expresión alternativos.

El mapa plasmídico de p4816-pUC-L-IR-18-kappa-BsmI se muestra en la figura 3a.

El vector de expresión p4817-pUC-H-IR-18-gamma1-BsmI (p4817) de la cadena pesada gamma-1 del anticuerpo anti-IGF-1R está compuesto de los elementos siguientes:

- un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* (ori de pUC),
- un gen beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli* (Amp),
- una unidad transcripcional para la expresión de la cadena pesada gamma-1 del anticuerpo anti-IGF-1R compuesta de los elementos siguientes:
- el promotor inmediato-temprano mayor e intensificador del citomegalovirus humano (CMV_h IE1),
- un 5'-UTR sintético, incluyendo una secuencia de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal (L1_Intrón_L2),
- el ADNc de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-IGF-1R clonado, dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donador de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- la región constante del gen cadena pesada γ 1 humana genómico, incluyendo Ig mu(m) de ratón-intensificador [NotI_Ig-m de ratón-intensificador_intrón-2 humano_CH1-CH2-CH3 con intrones intermedios],
- el 3' UTR de inmunoglobulina γ 1 humana, incluyendo la secuencia de señal de poliadenilación,
- los sitios de restricción únicos SgrAI y Ascl en los extremos 5' y 3', respectivamente, para permitir la transferencia del casete de expresión a plásmidos de expresión alternativos.

El mapa plasmídico de p4817-pUC-L-IR-18-gamma-1-BsmI se muestra en la figura 3b.

- Los plásmidos p4818-pUC-Hyg-OriP-Heavy-IR18-BsmI (p4818) y p4819-pUC-Hyg-OriP-Light-IR18-BsmI (p4819), mostrados en la figura 4, se derivaron de los plásmidos p4817-pUC-H-IR18-gamma1-BsmI y p4816-pUC-L-IR18-kappa-BsmI, respectivamente, mediante la introducción de dos elementos:
 - un gen de resistencia a la higromicina adecuado como marcador seleccionable en células eucarióticas,
 - el origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr.
- Los mapas plasmídicos de p4818-pUC-Hyg-OriP-Heavy-IR18-BsmI y p4819-pUC-Hyg-OriP-Light-IR18-BsmI se muestran en las figuras 4a) y 4b).

El plásmido p4821-pUC-Hyg-OriP-IR18-heavy-light-BsmI se construyó mediante la introducción del fragmento SgrAI/Ascl de p4818 que comprendía la unidad transcripcional de la cadena pesada gamma-1 en los sitios de restricción SgrAI y Ascl de p4819. El plásmido resultante contenía los mismos elementos que p4818, incluyendo oriP de VEB y la unidad transcripcional de la cadena ligera kappa, más la unidad transcripcional de la cadena pesada gamma-1.

El mapa plasmídico de p4821-pUC-Hyg-OriP-IR18-cadena pesada-ligera-BsmI se muestra en la figura 5.

Ejemplo 4

Producción de anticuerpos por células DG-700-IIIIE3sub1 positivas para EBNA-1 a partir de plásmidos portadores de oriP

Se mantuvieron células DG-700-IIIIE3sub1 y de tipo CHO-DG44 no modificadas en ProCHO4-CDM (Cambrex, nº de cat. BE12-029Q), glutamina 2 mM, suplemento HT 50x al 2% (v/v) (Invitrogen, nº de cat. 41065-012) y G418 300 mg/ml en cultivo estacionario a 37°C con 5% de CO₂. Una hora antes de la transfección se recolectaron células mediante centrifugación y se resuspendieron en medio DHI (Schlaeger E.J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996) a una densidad de 0,5x10⁶ células/ml.

La transfección se llevó a cabo utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, nº de cat. 11668-027). Para la transfección se 1 ml de volumen de cultivo se agruparon los componentes siguientes: 200 ml de OptiMEM I (Invitrogen, nº de cat. 31985-047), 2 mg de ADN y 6 ml de lipofectamina. Tras 5 a 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió la mezcla a las células. Cinco a diez días después de la transfección se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se sometió a ensayo para la concentración de anticuerpo, tal como se describe en el Ejemplo 1f).

Se transfectaron tres conjuntos diferentes de plásmidos en la línea celular CHO-DG44 o en la línea celular DG-700-IIIIE3sub1 derivada de CHO-DG44 expresante de EBNA-1. El plásmido p4816 para la expresión de cadena ligera de anticuerpo se cotransfectó con p4817 para la expresión de cadena pesada de anticuerpo. Ninguno de los plásmidos portaba oriP de VEB. El plásmido p4819 para la expresión de cadena ligera de anticuerpo se cotransfectó con p4818 para la expresión de cadena pesada de anticuerpo. Ninguno de los plásmidos portaba oriP de VEB. Finalmente, el plásmido p4821 para la expresión de tanto cadena ligera como pesada de anticuerpo se transfectó solo. El plásmido p4821 portaba oriP de VEB.

Tal como se muestra en la figura 6, la transfección de los plásmidos portadores de oriP p4818 y p4819 en células DG-700-IIIIE3sub1 positivas para EBNA-1 resultó en una expresión incrementada dos a tres veces de anticuerpo en

5 comparación con la transfección de p4816 y p4817 sin oriP en la misma línea celular o en células CHO-DG44 negativas para EBNA-1. La expresión del anticuerpo en células DG-700-IIIIE3sub1 era incluso más fuerte al agrupar los casetes de expresión para las cadenas ligera y pesada de anticuerpo en un único plásmido portador de oriP tal como p4821. En contraste, los plásmidos portadores de oriP p4817/p4818 y p4821 no rindieron niveles incrementados de expresión de anticuerpo en las células CHO-DG44 negativas para EBNA-1. En consecuencia, la expresión máxima de la inmunoglobulina se consiguió al transfectar los plásmidos portadores de oriP en células CHO positivas para EBNA-1.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Expresión de proteínas en células de roedor

<130> Case 23391 WO

<150> EP 05023611.6

<151> 2005-10-28

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 1998

<212> ADN

<213> Virus de Epstein-Barr

<400> 1

```

gaattctatc attaaacggc atgcaggaaa aggacaagca gcgaaaattc acgccccctt      60
gggaggtggc ggcatatgca aaggatagca ctcccactct actactgggt atcatatgct      120
gactgtatat gcatgaggat agcatatgct acccggatac agattaggat agcatatact      180
accagatat agattaggat agcatatgct acccagatat agattaggat agcctatgct      240
accagatat aaattaggat agcatatact acccagatat agattaggat agcatatgct      300
accagatat agattaggat agcctatgct acccagatat agattaggat agcatatgct      360
accagatat agattaggat agcatatgct atccagatat ttgggtagta tatgctaccc      420
agatataaat taggatagca tatactaccc taatctctat taggatagca tatgctaccc      480
ggatacagat taggatagca tatactaccc agatatagat taggatagca tatgctaccc      540
agatatagat taggatagcc tatgctaccc agatataaat taggatagca tatactaccc      600
agatatagat taggatagca tatgctaccc agatatagat taggatagcc tatgctaccc      660
agatatagat taggatagca tatgctatcc agatatttgg gtagtatatg ctacccatgg      720
caacattagc ccaccgtgct ctcagcgacc tcgtgaatat gaggaccaac aaccctgtgc      780
ttggcgctca ggcgcaagtg tgtgtaattt gtccctccaga tcgcagcaat cgcgccccta      840
tcttggcccc ccacctact tatgcaggta ttccccgggg tgccattagt ggttttgtgg      900
gcaagtggtt tgaccgcagt ggtagcggg gttacaatca gccaagttat tacaccctta      960
ttttacagtc caaaaccgca gggcggcgtg tgggggctga cgcgtgcccc cactccacaa     1020
tttcaaaaaa aagagtggcc acttgccttt gtttatgggc cccattggcg tggagccccg     1080
tttaattttc gggggtgtta gagacaacca gtggagtccg ctgctgtcgg cgtccactct     1140

```

15

ES 2 461 591 T3

ctttcccctt gttacaaata gagggtaacá acatggttca cctgtcttgg tccctgectg 1200
 ggacacatct taataacccc agtatcatat tgcactagga ttatgtgttg cccatagcca 1260
 taaattcgtg tgagatggac atccagtctt tacggcttgt ccccaccca tggatttcta 1320
 ttgttaaaga tattcagaat gtttcattcc tacactagta tttattgccc aagggggttg 1380
 tgaggggttat attggtgtca tagcacaatg ccaccactga acccccgc caaattttat 1440
 tctgggggcg tcacctgaaa ccttgttttc gagcacctca catacacctt actgttcaca 1500
 actcagcagt tattctatta gctaaacgaa ggagaatgaa gaagcaggcg aagattcagg 1560
 agagttcact gcccgctcct tgatcttcag ccaactgcct tgtgactaaa atggttcact 1620
 accctcgtgg aatcctgacc ccatgtaaata aaaaccgtga cagctcatgg ggtgggagat 1680
 atcgcgtgtc cttaggacct ttttactaac cctaattcga tagcatatgc ttcccgttg 1740
 gtaacatatg ctattgaatt agggtagtc tggatagtat atactactac ccgggaagca 1800
 tatgctaccc gtttagggtt aacaagggg ccttataaac actattgcta atgccctctt 1860
 gagggccgc ttatcggtag ctacacaggc ccctctgatt gacgttggtg tagcctccc 1920
 tagtcttctt gggcccctgg gaggtacatg tccccagca ttggtgtaag agcttcagcc 1980
 aagagttaca cataaagg 1998

<210> 2
 <211> 146
 <212> ADN
 <213> Virus de Epstein-Barr

5

<400> 2

gatatcgtg ttccttagga cccttttact aaccctaatt cgatagcata tgcttcccg 60
 tgggtaacat atgctaattga attaggggta gtctggatag tatatactac tacccgggaa 120
 gcatatgcta cccgtttagg gttaac 146

10

<210> 3
 <211> 622
 <212> ADN
 <213> Virus de Epstein-Barr

15

<400> 3

gggtatcata tgctgactgt atatgcatga ggatagcata tgctaccagg atacagatta 60
 ggatagcata tactaccag atatagatta ggatagcata tgctaccag atatagatta 120
 ggatagccta tgctaccag atataaatta ggatagcata tactaccag atatagatta 180
 ggatagcata tgctaccag atatagatta ggatagccta tgctaccag atatagatta 240
 ggatagcata tgctaccag atatagatta ggatagcata tgctatccag atatttgggt 300

ES 2 461 591 T3

agtatatgct acccagatat aaattaggat agcatatact accctaactct ctattaggat 360
 agcatatgct acccggatac agattaggat agcatatact acccagatat agattaggat 420
 agcatatgct acccagatat agattaggat agcctatgct acccagatat aaattaggat 480
 agcatatact acccagatat agattaggat agcatatgct acccagatat agattaggat 540
 agcctatgct acccagatat agattaggat agcatatgct atccagatat ttgggtagta 600
 tatgctaccc atggcaacat ta 622

<210> 4
 <211> 1926
 <212> ADN
 <213> Virus de Epstein-Barr

5

<400> 4

atgtctgacg aggggccagg tacaggacct ggaaatggcc taggagagaa gggagacaca 60
 tctggaccag aaggctccgg cggcagtgga cctcaaagaa gagggggtga taaccatgga 120
 cgaggacggg gaagaggacg aggacgagga ggcggaagac caggagcccc gggcggctca 180
 ggatcagggc caagacatag agatggtgtc cggagacccc aaaaacgtcc aagttgcatt 240
 ggctgcaaag ggaccacagg tggaacagga gcaggagcag gagcgggagg ggcaggagca 300
 ggaggggagc gagcaggagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggaggg 360
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggagcaggag gaggggcagg aggggcagga 420
 ggggcaggag caggaggagg ggcaggagca ggaggagggg caggaggggc aggagcagga 480
 ggaggggagc gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagc aggaggggg 540
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggaggggagc gaggggcagg agcaggagga 600
 ggggcaggag caggaggggc aggaggggca ggaggggagc gagcaggagg ggcaggagca 660
 ggaggagggg caggaggggc aggaggggca ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca 720
 ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca ggaggggagc gagcaggagg ggcaggaggg 780
 gcaggagcag gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggagca 840
 ggaggagggg caggaggggc aggagcagga ggggcaggag gggcaggagc aggaggggca 900
 ggaggggagc gagcaggagg ggcaggaggg gcaggagcag gaggaggggc aggagcagga 960
 ggggcaggag caggaggtgg aggccggggt cgaggaggca gtggaggccg gggtcgagga 1020
 ggtagtggag gccggggtcg aggaggtagt ggaggccgcc gggtagagg acgtgaaaga 1080
 gccagggggg gaagtcgtga aagagccagg gggagaggtc gtggacgtgg agaaaagagg 1140
 cccaggagtc ccagtagtca gtcacatca tccgggtctc caccgcgag gccccctcca 1200

10

ES 2 461 591 T3

ggtāgaaggc catttttcca ccctgtaggg gaagccgatt attttgaata ccaccaagaa 1260
 ggtggcccag atggtgagcc tgacgtgccc cggggagcga tagagcaggg ccccgcatat 1320
 gaccagggag aaggcccaag cactggaccc cggggtcagg gtgatggagg caggcgcaaa 1380
 aaaggagggt ggtttgaaa gcatcgtggt caaggagggt ccaaccgaa atttgagaac 1440
 attgcagaag gtttaagagc tctcctggct aggagtcacg tagaaaggac taccgacgaa 1500
 ggaacttggg tcgccggtgt gttcgtatat ggaggtagta agacctcct ttacaaccta 1560
 aggcgaggaa ctgcccttgc tattccacaa tgtcgtctta caccattgag tcgtctcccc 1620
 tttggaatgg cccctggacc cggcccacaa cctggcccgc taagggagtc cattgtctgt 1680
 tatttcatgg tctttttaca aactcatata tttgctgagg ttttgaagga tgcgattaag 1740
 gaccttgta tgacaaagcc cgtcctacc tgcaatatca gggtgactgt gtgcagcttt 1800
 gacgatggag tagatttgc tccctggttt ccacctatgg tggaaagggc tgccgaggag 1860
 ggtgatgacg gagatgacgg agatgaagga ggtgatggag atgagggtga ggaagggcag 1920
 gagtga 1926

<210> 5

<211> 641

5 <212> PRT

<213> Virus de Epstein-Barr

<400> 5

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
 20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
 50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
 65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

10

ES 2 461 591 T3

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
 165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
 210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 325 330 335

ES 2 461 591 T3

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg
 355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro
 370 375 380

Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro
 385 390 395 400

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
 405 410 415

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
 420 425 430

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
 435 440 445

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
 450 455 460

Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
 465 470 475 480

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
 485 490 495

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
 500 505 510

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
 515 520 525

Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
 530 535 540

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
 545 550 555 560

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
 565 570 575

ES 2 461 591 T3

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
 580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
 595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
 610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
 625 630 635 640

Glu

<210> 6
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador

<400> 6
 cgtttagtga accgtagat cgcaaaaagc ttttttaac acgta 45

<210> 7
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador

<400> 7
 gtgttaaaaa aagcttttg cgatctgacg gttcactaaa cgagct 46

<210> 8
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador

<400> 8
 tttttaagc tttgccacca tgtctgacga ggggccaggt acag 44

<210> 9
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador

<400> 9
 tttttcact acgtgggtgc tggttgctcc cattcttagg tg 42

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula CHO, caracterizada por que dicha célula CHO:
- a) expresa el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA1 se encuentra operablemente ligada a un promotor fuerte y se integra en el ADN cromosómico y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB integrada en el ADN cromosómico;
- 10 b) contiene un episoma, en el que dicho episoma comprende:
- (i) un origen de replicación procariótico,
- (ii) un marcador de selección,
- (iii) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como elemento único derivado del VEB y no contiene una copia funcional del gen estructural de EBNA-1,
- 15 (iv) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicho polipéptido heterólogo y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación,
- 20 c) no contiene el antígeno T grande del virus del polioma.
2. Célula CHO según la reivindicación 1, caracterizada porque el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente ligado a un promotor heterólogo.
3. Método para obtener una célula CHO, caracterizado porque dicho método comprende las etapas de:
- 25 a) proporcionar una célula CHO que no contiene el antígeno T grande del virus del polioma; b) proporcionar un plásmido que comprende:
- (i) un origen de replicación procariótico;
- (ii) un marcador de selección;
- 30 (iii) un casete de expresión funcional para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de EBNA-1 y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación,
- 35 en el que el plásmido no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB,
- c) introducir dicho plásmido b) en la célula CHO a) y seleccionar una célula CHO establemente transformada,
- d) proporcionar entre uno y cuatro plásmidos adicionales, que comprenden:
- (i) un origen de replicación procariótico;
- (ii) un marcador de selección;
- 40 (iii) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como único elemento derivado del VEB,
- (iv) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO transformada, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido heterólogo y una región 3' no traducida con una señal de poliadenilación,
- (v) ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1,
- 45 e) introducir dichos plásmidos adicionales d) en dicha célula CHO establemente transformada.
4. Método para la producción de un polipéptido heterólogo, caracterizado porque dicho método comprende:
- a) proporcionar una célula CHO según la reivindicación 1; b) cultivar dicha célula CHO bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido heterólogo;c) recuperar dicho polipéptido a partir del cultivo.
- 50 5. Kit para la producción de una célula CHO según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho kit comprende:
- a) una célula CHO que no contiene el antígeno T grande del virus del polioma; b) un primer plásmido que comprende:
- 55 (i) un origen de replicación procariótico;
- (ii) un marcador de selección;
- (iii) un casete de expresión funcional para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1), en el que dicho
- 60 casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de EBNA-1 y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación;

en el que el plásmido no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB,c) un segundo plásmido que comprende:

- 5 (i) un origen de replicación procariótico;
 (ii) un marcador de selección;
 (iii) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como único elemento derivado del VEB,
 (iv) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula de roedor, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, un sitio de clonación para la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos y una región 3'
 10 no traducida que comprende una señal de poliadenilación,
 (v) ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado porque dicho polipéptido heterólogo se selecciona de entre el grupo que comprende profármacos, enzimas, fragmentos de enzima, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos, polipéptidos biológicamente activos, proteínas hedgehog, proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas, interferones, inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina.

15

7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina.

20

8. Método para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula CHO, caracterizado porque dicho método comprende:

25 a) proporcionar una célula CHO establemente transfectada con el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 y que no contiene el antígeno T grande del virus del poliovirus, en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente ligado a un promotor fuerte y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia oriP del VEB, b) transfectar dicha célula CHO con un plásmido de expresión que comprende:

- 30 (i) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como único elemento derivado del VEB,
 (ii) ningún gen estructural codificante de la proteína EBNA-1,
 (iii) un origen de replicación procariótico,
 (iv) un marcador de selección,
 35 (v) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido heterólogo en dicha célula CHO, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicha proteína heteróloga y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación;

40 c) cultivar dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido heterólogo, d) recuperar dicho polipéptido heterólogo a partir del cultivo.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 y 6 a 8, caracterizado porque dicho polipéptido heterólogo es un polipéptido heterólogo secretado.

45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 y 6 a 9, caracterizado porque dicho cultivo se lleva a cabo bajo transfección transitoria.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 y 6 a 10, caracterizado porque dicha célula CHO se selecciona de entre el grupo que comprende células CHO-DBX11, células CHO-K1, células CHO-DG44 y células CHO que expresan EBNA-1.

50

12. Método para la producción de una inmunoglobulina heteróloga, caracterizado porque dicho método comprende las etapas siguientes:

- 55 a) proporcionar una célula CHO que:
 (i) expresa el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1);
 (ii) contiene un episoma, en el que dicho episoma comprende:

- 60 (i) un origen de replicación procariótico;
 (ii) un marcador de selección;
 (iii) un origen de replicación (oriP) del virus de Epstein-Barr (VEB) como único elemento derivado del VEB,

- (iv) un casete de expresión adecuado para la expresión de una inmunoglobulina heteróloga en dicha célula CHO, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia de promotor, una región 5' no traducida, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicha inmunoglobulina heteróloga y una región 3' no traducida que comprende una señal de poliadenilación,
- 5 (iii) no contiene el antígeno T grande del virus del polio,
- (iv) en el que el gen estructural codificante de la proteína EBNA-1 se encuentra operablemente ligado a un promotor fuerte y
- se integra en el ADN cromosómico y la célula no contiene una copia funcional de la secuencia de oriP del VEB integrada en el ADN cromosómico;
- 10 b) cultivar dicha célula CHO bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicha inmunoglobulina heteróloga,
- c) recuperar dicha inmunoglobulina heteróloga a partir del cultivo.

Figura 1

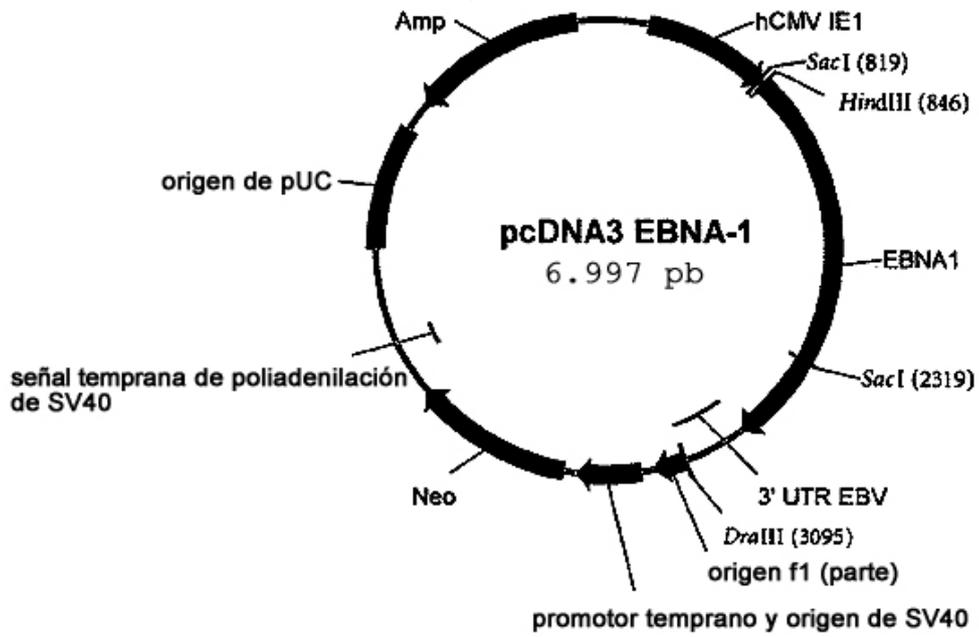
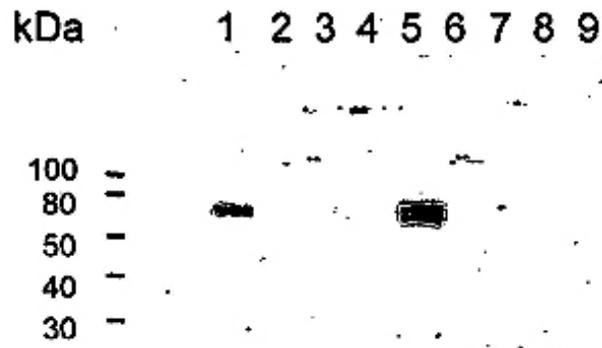


Figura 2

A



B

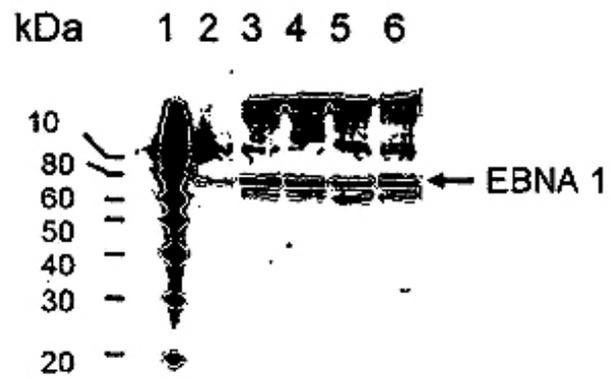
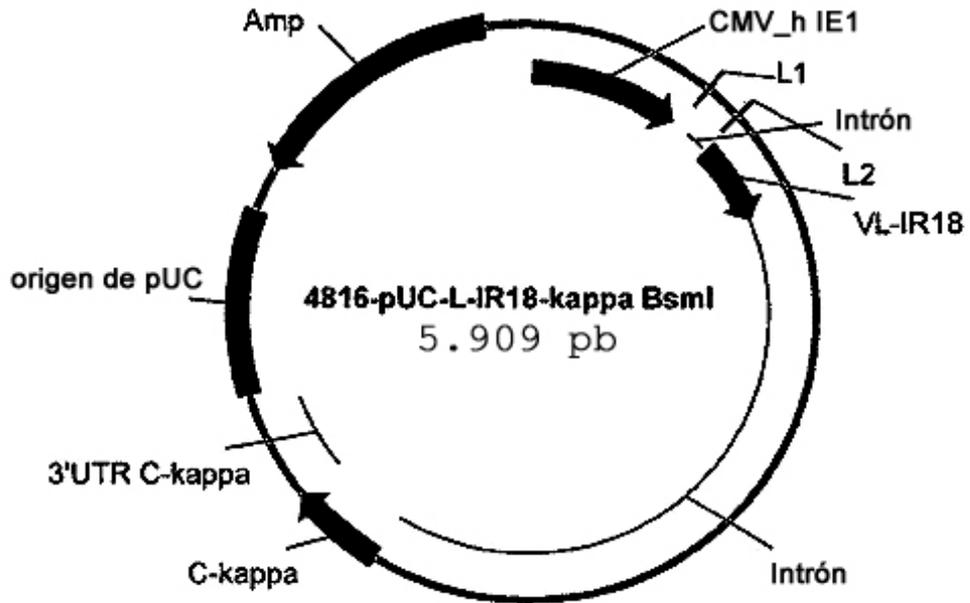


Figura 3

a)



b)

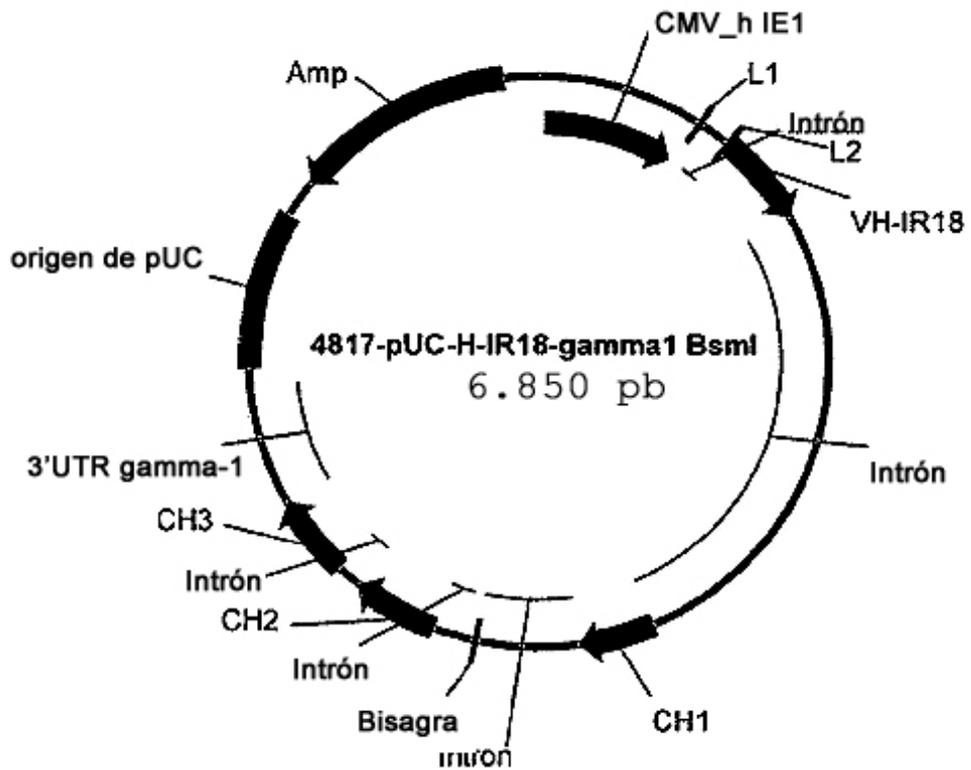
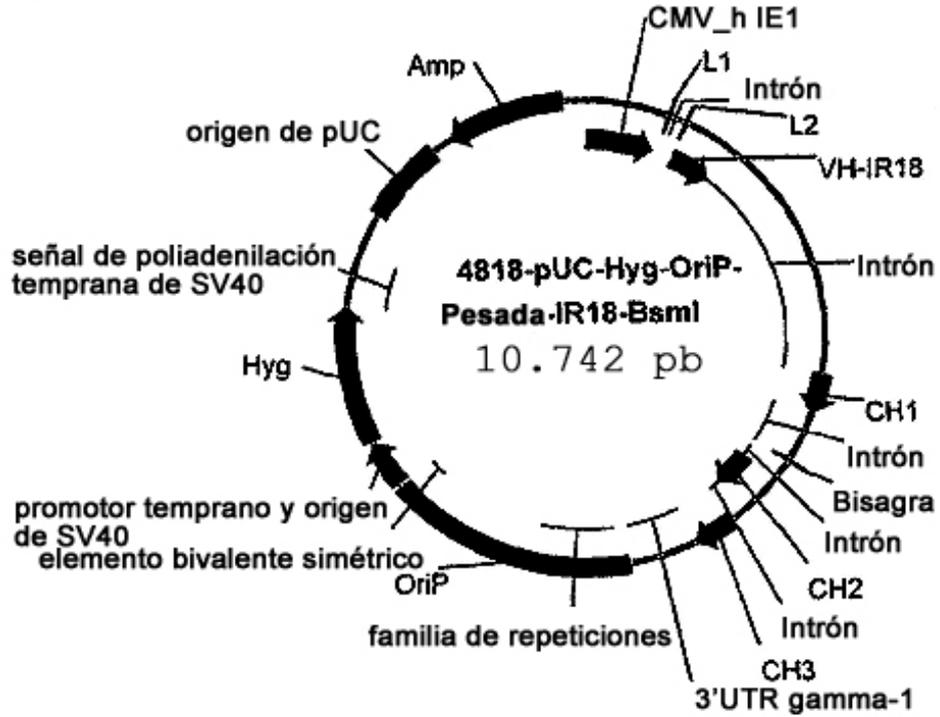


Figura 4

a)



b)

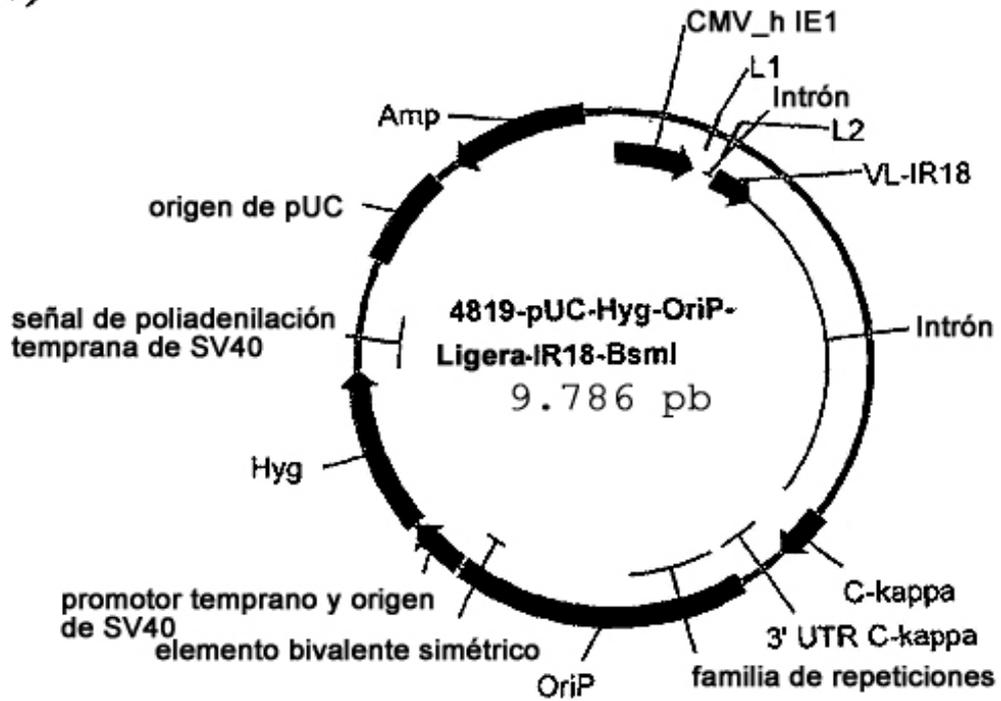


Figura 5

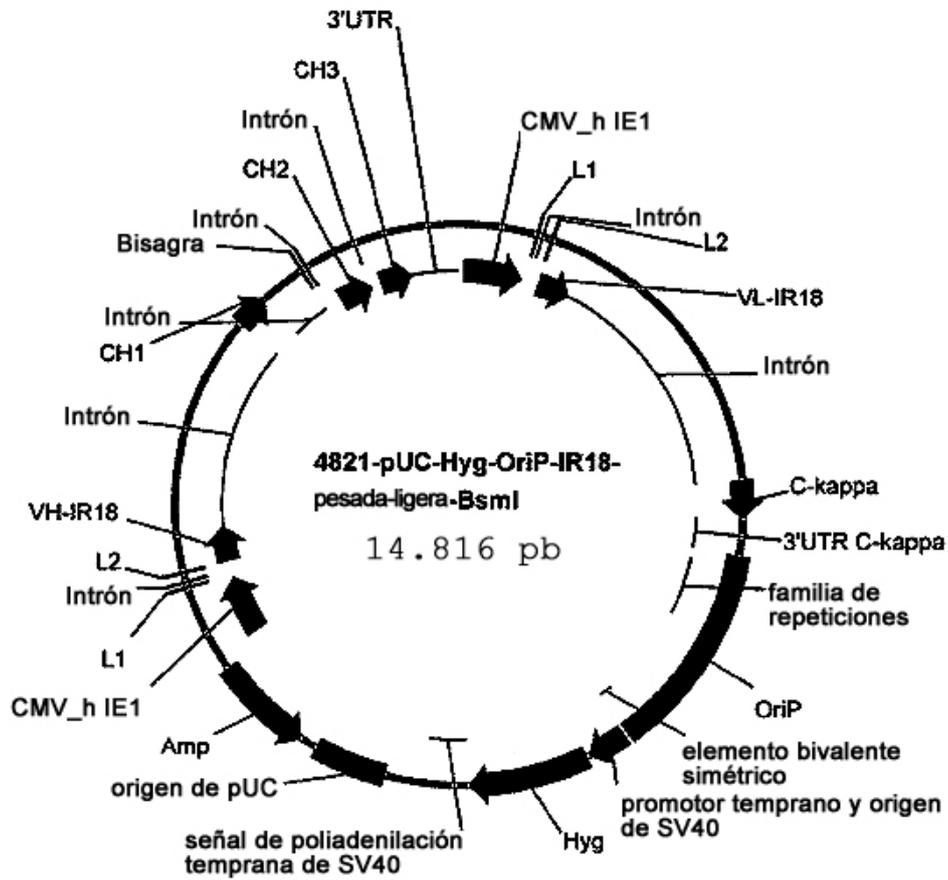
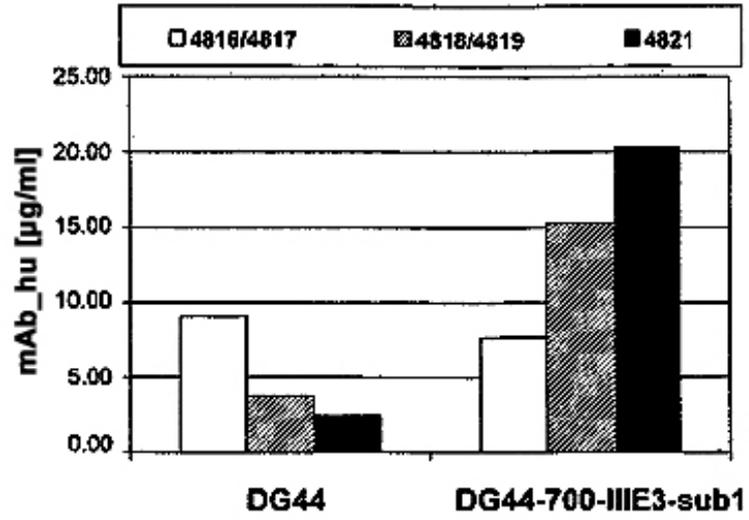


Figura 6
a)



b)

