

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 294**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 08841014 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2213746**

54 Título: **Célula para su uso en la producción de proteína exógena, y procedimiento de producción usando la célula**

30 Prioridad:

**24.10.2007 JP 2007276182**

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

**15.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 548 294 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

Célula para su uso en la producción de proteína exógena, y procedimiento de producción usando la célula

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una célula que va a usarse en la producción de heteroproteínas y a un método de producción usando la célula. En más detalle, la presente invención se refiere a una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato y a un método para producir un polipéptido usando la célula.

**Técnica anterior**

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

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

En estas circunstancias, se desea un método de producción de proteínas con mayor eficacia de producción.

20 Un intercambiador aniónico es un transportador que media el antiporte de aniones intracelulares y extracelulares a través de una membrana plasmática (proteína de transporte de membrana). Una familia SLC4 es una familia de transportadores de  $\text{HCO}_3^-$ , y tres miembros pertenecientes a la familia SLC4, concretamente AE1, AE2 y AE3, tienen la función de intercambiar  $\text{Cl}^-$  fuera de una membrana plasmática por  $\text{HCO}_3^-$  dentro de una membrana plasmática.

En el riñón, se encuentra AE1 en células  $\alpha$  intercaladas en los conductos colectores en la membrana basolateral (documento no de patente 1). Se ha sabido que mutaciones en AE1 humano producen acidosis tubular renal distal (documentos no de patente 2 y 3).

25 Además, en el riñón, se han encontrado tres isoformas de AE2, concretamente AE2a, AE2b y AE2c. Se considera que AE2 regula la homeostasis del pH intracelular para la transducción de señales celulares (documento no de patente 4). Sin embargo, se ha encontrado que un ratón deficiente en AE2 que muere durante el periodo de destete no padece anomalías fenotípicas renales (documento no de patente 5).

30 SLC26 es una familia de intercambiadores aniónicos relativamente nueva, y se ha sugerido que un gran número de sus miembros (por ejemplo, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6 y SLC26A9) son intercambiadores de bicarbonato (documentos no de patente 6 a 11).

Por otra parte, se desconoce absolutamente si expresando fuertemente un intercambiador aniónico que tiene una función de transportador de bicarbonato, puede promoverse artificialmente la captación de aniones al interior de una célula en cultivo y la excreción de aniones al exterior de la célula, mediado por el intercambiador aniónico, lo que contribuye a la mejora en la producción de una proteína recombinante deseada en la célula en cultivo.

35 [Documento no de patente 1]

van Adelsberg JS. *et. al.*, J Biol Chem 1993; 268:11283-11289

[Documento no de patente 2]

Shayakui C. *et. al.*, Curr Opin Nephrol Hypertens 2000; 9:541-546

[Documento no de patente 3]

40 Alper SL. *et. al.*, Annu Rev Physiol 2002; 64:899-923

[Documento no de patente 4]

Komlosi P. *et. al.*, Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288:F380-F386

[Documento no de patente 5]

Gawenis LR. *et. al.*, J Biol Chem 2004; 279:30531-30539

45 [Documento no de patente 6]

Melvin *et al*, J Biol Chem 1999; 274:22855-22861

[Documento no de patente 7]

Ko *et al.*, EMBO J. 2002; 21:5662-5672

[Documento no de patente 8]

Soleimani *et al.*, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2001; 280:F356-F364

5 [Documento no de patente 9]

Wang *et al.*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2002; 282:G573-G579

[Documento no de patente 10]

Petrovic *et al.*, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004; 286:F161-F169

[Documento no de patente 11]

10 Xu *et al.*, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005; 289:C493-C505

### **Descripción de la invención**

#### **Problemas que va a solucionar la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método que pueda producir un polipéptido eficazmente.

#### **Medios para resolver el problema**

15 Como resultado de extensas e intensivas investigaciones enfocadas a la solución del problema anterior, los presentes inventores han encontrado que es posible aumentar el rendimiento de un polipéptido deseado mediante el uso de una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato. Así se ha logrado la presente invención. Además, el péptido deseado podría producirse en una cantidad incluso mayor mediante el uso de células que pueden coexpresar un transportador de bicarbonato y ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa (a continuación en el presente documento denominada en ocasiones "CSAD") o alanina aminotransferasa (a continuación en el presente documento denominada en ocasiones "ALT").

La presente invención puede resumirse de la siguiente manera.

25 (1) Un método de producción de un polipéptido, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato y tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado y permitiendo de ese modo que la célula produzca dicho polipéptido.

(2) El método de (1) anterior, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato es una célula a la que se ha transferido un ADN que codifica el transportador de bicarbonato.

(3) El método de producción de (1) ó (2) anterior, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato expresa además fuertemente ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa.

30 (4) El método de producción según uno cualquiera de (1)-(3) anteriores, en el que el transportador de bicarbonato es un intercambiador aniónico SLC4 o un intercambiador aniónico SLC26.

(5) El método de producción según uno cualquiera de (1)-(3) anteriores, en el que el transportador de bicarbonato es un intercambiador aniónico SLC4.

(6) El método de producción de (5) anterior, en el que el intercambiador aniónico SLC4 es AE1.

35 (7) El método según uno cualquiera de (1)-(6) anteriores, en el que la célula son células de ovario de hámster chino.

(8) El método según uno cualquiera de (1)-(7) anteriores, en el que el péptido deseado es un anticuerpo.

(9) El método según uno cualquiera de (4)-(6) anteriores, en el que el ADN que codifica el intercambiador aniónico SLC4 es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e):

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

(b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;

(c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 50% o más con la

secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 y que aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;

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

5 (e) un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4.

(10) Un método de preparación de un producto farmacéutico que contiene un polipéptido preparado mediante el método según uno cualquiera de (1)-(9) anteriores.

10 (11) Una célula que tiene un ADN transferido que codifica un transportador de bicarbonato y un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado.

(12) La célula según (11) anterior, que tiene además un ADN transferido que codifica ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa.

(13) Una célula que tiene un ADN transferido que codifica un transportador de bicarbonato y un ADN transferido que codifica ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa.

## 15 Efecto de la invención

Según la presente invención, se ha hecho posible producir un polipéptido deseado con alto rendimiento.

La presente memoria descriptiva engloba el contenido descrito en la memoria descriptiva y/o los dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2007-276182 basándose en la cual la presente solicitud de patente reivindica prioridad.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una topología de membrana de AE1 producida basándose en un dominio transmembrana y la dirección predicha a partir de una secuencia de aminoácidos de AE1 derivado de células hepáticas humanas tal como se obtiene mediante el programa TMpred con referencia a la figura 1 en Exo Physiol 91.1 págs. 153-161, 2006, Seth L. Alper.

25 La figura 2 muestra un plásmido para selección con higromicina, en el que se ha expresado AE1 humano (911 aminoácidos).

La figura 3 muestra un plásmido para selección con puromicina, en el que se ha expresado AE1 humano (911 aminoácidos).

30 La figura 4 es una representación gráfica de la cantidad de producción de anticuerpos anti-glipicano-3 en el día 12 de cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml. La cantidad de un anticuerpo anti-glipicano-3 producido por células transformadas con pHyg-AE1 (n=4) fue significativamente mayor que la producida por células transformadas con pHyg (n=4) ( $P < 0,05$ ).

35 La figura 5 es una representación gráfica de la cantidad de producción de anticuerpos anti-glipicano-3 en el día 10 de cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml. La cantidad de un anticuerpo anti-glipicano-3 producido por una cepa de células que coexpresa AE1/CSAD (n=9) que se obtuvo introduciendo pPur-CSAD en una cepa pHyg-AE1-42, o una célula transformada con pHyg-AE1 que puede producir anticuerpos con alto rendimiento, fue significativamente mayor que la producida por células que coexpresan AE1/pPur (n=8) que se obtuvieron introduciendo pPur en una cepa pHyg-AE1-42 ( $P < 0,05$ ).

40 La figura 6 es una representación gráfica de las tasas de supervivencia en el día 10 de cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml. La tasa de supervivencia de una cepa de células que coexpresa AE1/CSAD (n=9) que se obtuvo introduciendo pPur-CSAD en una cepa pHyg-AE1-42, o una célula transformada con pHyg-AE1 que puede producir anticuerpos con alto rendimiento, fue significativamente mayor que la de células que coexpresan AE1/pPur (n=8) que se obtuvieron introduciendo pPur en una cepa pHyg-AE1-42 ( $P < 0,01$ ).

Las tasas de supervivencia en el día 7 del cultivo también se caracterizaron por  $P < 0,01$  (datos no mostrados).

45 La figura 7 es una representación gráfica de la cantidad de producción de anticuerpos anti-glipicano-3 en el día 8 de cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml. La cantidad de un anticuerpo anti-glipicano-3 producido por una cepa de células que coexpresa AE1/ALT (n=10) que se obtuvo introduciendo pPur-ALT1 en una cepa pHyg-AE1-42, o una célula transformada con pHyg-AE1 que puede producir anticuerpos con alto rendimiento, fue mayor que la producida por una cepa AE1/CSAD (n=9), y además, la cantidad del anticuerpo anti-glipicano-3 producido por  
50 una cepa de células que coexpresa AE1/ALT fue significativamente mayor que la producida por células que coexpresan AE1/pPur (n=8) que se obtuvieron introduciendo pPur en una cepa pHyg-AE1-42 ( $P < 0,01$ ).

La figura 8 es un gráfico que muestra la cantidad de un anticuerpo producido por AA53, o una cepa que coexpresa AE1/ALT1, durante cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l. La cantidad de producción de anticuerpos anti-glipicano-3 en el día 7 del cultivo fue de 1,9 g/l.

5 La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen de CSAD de hámster derivado de células CHO, recién clonado y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del mismo.

La figura 10 muestra un plásmido para selección con puromicina que se usó para expresar CSAD de hámster (493 aminoácidos).

La figura 11 muestra un plásmido para selección con puromicina que se usó para expresar ALT1 humana (496 aminoácidos).

10 La figura 12 es un gráfico que muestra la cantidad de un anticuerpo producido por una célula AE1-S08 que produce anticuerpos anti-IL-6R derivada de un huésped que expresa fuertemente AE1 durante cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l. La cantidad de producción de anticuerpos anti-IL-6R en el día 14 del cultivo fue de 3,0 g/l.

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen de transportador de taurina de hámster derivado de células CHO, recién clonado y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del mismo.

15 La figura 14 es una topología de membrana del transportador de taurina que se creó basándose en las regiones transmembrana y orientaciones predichas por el programa TMpred a partir de la secuencia de aminoácidos de un TauT de hámster derivado de células CHO, recién clonado con referencia a la figura 5 de Shinichi Uchida *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 89, págs. 8230-8234, septiembre de 1992. La marca © indica residuos de aminoácido específicos de TauT de hámster. Un gran número de residuos de aminoácido diferentes de los presentes en TauT humano están presentes en el 2º bucle (EX: región de membrana extracelular), la 12ª región transmembrana (TM) y el extremo C-terminal (IC: región intracelular).

20

La figura 15 muestra un plásmido para selección con higromicina, que se usó para expresar TauT de hámster (622 aminoácidos).

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

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

La presente invención proporciona un método de producción de un polipéptido, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato y tiene un ADN transferido que codifica un polipéptido deseado y permitiendo de ese modo que la célula produzca el polipéptido.

30 En el método de la presente invención, la célula puede ser o bien una célula natural que puede producir el péptido deseado o bien una célula transformada a la que se le ha transferido un ADN que codifica el péptido deseado. Preferiblemente, se usa una célula transformada a la que se ha transferido un ADN que codifica el péptido deseado.

35 En el método de la presente invención, el péptido deseado no está particularmente limitado. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido tal como un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-glipicano-3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-VSR, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-VLA4, y similares) o una proteína fisiológicamente activa (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleucina tal como IL-1 o IL-6, t-PA, urocinasa, albúmina sérica, factor de coagulación sanguínea, PTH, y similares). Se prefiere particularmente un anticuerpo, y puede ser cualquier anticuerpo tal como un anticuerpo natural, un anticuerpo de pequeño tamaño molecular (por ejemplo, Fab, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, etc.

40

Usando fuertemente una célula que expresa transportador de bicarbonato, puede aumentarse la cantidad de un polipéptido producido por células.

45 Un transportador de bicarbonato es una proteína de membrana que tiene una función de antiporte, mediante la cual se excretan aniones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) o aniones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) mientras que se captan aniones cloruro y aniones sulfato. Un transportador de bicarbonato puede ejemplificarse mediante un intercambiador aniónico SLC4 y un intercambiador aniónico SLC26.

50 Un intercambiador aniónico SLC4 es una proteína de membrana que regula la homeostasis del pH intracelular y el volumen celular. En la actualidad, se conocen 10 clases (SLC4A1 (AE1), SLC4A2 (AE2), SLC4A3 (AE3), SLC4A4 (NBCe1), SLC4A5 (NBCe2), SLC4A7 (NBCn1) SLC4A8 (kNBC3), SLC4A9 (NBCn2), SLC4A10 (NBCn3) y SLC4A11 (NaBC1)) de familias de SLC4, y existe al menos una clase de isoforma. Estos intercambiadores aniónicos SLC4 tienen diferentes funciones; por ejemplo, SLC4A1 (AE1), SLC4A2 (AE2), ALC4A3 (AE3) y ALC4A9 (NBCn2 o AE4) son intercambiadores no dependientes de  $\text{Na}^+$ , eléctricamente neutros para  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , ALC4A4 (NBCe1) y ALC4A5 (NBCe2) son electrogénicos, ALC4A7 (NBCn1) es un cotransportador eléctricamente neutro para  $\text{Na}^+$  y

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ALC4A8 (kNBC3) y ALC4A10 (NBCn3) son intercambiadores dependientes de Na, eléctricamente neutros para Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y ALC4A11 (NaBC1) es un cotransportador electrogénico para Na y borato. Los intercambiadores aniónicos SLC4 anteriores tienen una acción específica de sitio. Por ejemplo, en el caso de AE1, AE1 presente en células epiteliales polares contribuye a la secreción y resorción transepiteliales de ácidos y bases mientras que AE1 presente en eritrocitos de trucha promueve el transporte de osmolitos. El intercambiador aniónico SLC4 puede ejemplificarse mediante SLC4A1 (AE1), SLC4A2 (AE2), SLC4A3 (AE3), SLC4A4 (NBCe1), SLC4A5 (NBCe2), SLC4A7 (NBCn1), SLC4A8 (kNBC3), SLC4A9 (NBCn2), SLC4A10 (NBCn3) y SLC4A11 (NaBC1), entre los que es preferible AE1.

Un intercambiador aniónico SLC26 es una proteína de membrana multifuncional que actúa en casi todos los sistemas de órganos. Para el intercambiador aniónico SLC26, uno que media el antiporte de aniones sulfato, aniones yoduro, aniones formiato, aniones oxalato, aniones cloruro, aniones hidroxilo, aniones bicarbonato y similares, existe un canal de iones cloruro, o un motor molecular dependiente de aniones. Se considera que el intercambiador aniónico SLC26 está implicado en la homeostasis de diversos aniones y se conocen 10 clases (SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9 y SLC26A11) de familias de intercambiadores aniónicos. Por ejemplo, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6 y SLC26A9, que son transportadores para aniones hidroxilo y aniones bicarbonato, regulan el pH tanto dentro como fuera de una membrana de manera similar a un intercambiador aniónico SLC4. SLC26A1, SLC26A2, SLC26A4, SLC26A6, SLC26A9 y SLC26A11 se expresan en el riñón. SLC26A1 transporta aniones sulfato y aniones oxalato mientras que SLC26A6 media en el antiporte de diversos aniones con el fin de captar cloruro de sodio. SLC26A1, SLC26A4 y SLC26A6 y SLC26A5 se han convertido en factores causantes de nefrolitiasis, hipertensión y pérdida auditiva, respectivamente. SLC26A7 está implicado en la homeostasis ácido-base y el control de la tensión arterial de manera similar a SLC26A4. El intercambiador aniónico SLC26 puede ejemplificarse mediante SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9 y SLC26A11.

Una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato no está particularmente limitada siempre que la célula tenga un nivel de expresión aumentado de un transportador de bicarbonato en comparación con una célula natural correspondiente. La célula natural no está particularmente limitada. Puede usarse una célula que se usa como huésped en la producción de una proteína recombinante (por ejemplo, células CHO).

Un transportador de bicarbonato que va a expresarse fuertemente en una célula puede derivarse de cualquier organismo y no se impone ninguna limitación particular sobre el mismo. Específicamente, el transportador de bicarbonato puede derivarse de organismos incluyendo un ser humano, roedores tales como un ratón, una rata y un hámster, mamíferos tales como un chimpancé, una vaca, un caballo, un perro y un lobo, aves tales como una gallina, peces tales como un pez cebra y una anguila, e insectos tales como *Drosophila*; el transportador de bicarbonato se deriva preferiblemente de un ser humano, roedores, o la misma especie que la célula huésped. Por ejemplo, en un caso en el que la célula en la que va a expresarse fuertemente un transportador de bicarbonato es una célula de ovario de hámster chino (célula CHO), el transportador de bicarbonato se deriva preferiblemente de un ser humano o un hámster.

La célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato puede ser cualquier célula, por ejemplo, célula eucariota tal como células animales, vegetales y de levaduras, célula procariota tal como *E. coli* y *B. subtilis*, etc. Preferiblemente, se usan células animales tales como CHO y COS, se prefieren particularmente células CHO. Con el fin de preparar un polipéptido deseado, se prefieren células adecuadas para la transferencia de un gen que codifica el péptido deseado tales como células CHO-dhfr-.

Como célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato, puede facilitarse una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de transportador de bicarbonato (por ejemplo, gen de intercambiador aniónico SLC4, gen de intercambiador aniónico SLC26, etc.). Una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de transportador de bicarbonato puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una célula de este tipo puede prepararse incorporando un transportador de bicarbonato dentro de un vector y transformando el vector dentro de una célula. Además, el concepto de "células a las que se ha transferido artificialmente un gen de transportador de bicarbonato" engloba en el presente documento células en las se ha activado un gen de transportador de bicarbonato endógeno mediante tecnología de activación génica (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO94/12650) de modo que el transportador de bicarbonato se expresa fuertemente.

Como gen de intercambiador aniónico SLC4 que va a transferirse a una célula, puede usarse uno cualquiera de los siguientes ADN (a) a (e) que codifican un intercambiador aniónico SLC4.

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

(b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;

(c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 50% o más con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 y que aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;

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

5 (e) un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4.

10 El concepto de una actividad de intercambiador aniónico SLC4 engloba una actividad de captar  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  presentes en el medio y excretar  $\text{HCO}_3^-$  y borato intracelulares con el fin de mantener la homeostasis del pH intracelular y el volumen celular.

La actividad de intercambiador aniónico SLC4 puede medirse de la siguiente manera.

15 Se tratan células en las que se expresa funcionalmente SLC4 con BCECF-AM que es un colorante sensible al pH. Entonces, se compara la intensidad de fluorescencia entre células que se han perfundido con un medio que contiene  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  y células que se han perfundido con un medio libre de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , mediante lo cual pueden medirse los cambios en el pH intracelular (pHi) (Dahl NK. *et al.*, J Biol Chem 2003; 278:44949-44958; Fujinaga J. *et al.*, J Biol Chem 1999; 274:6626-6633).

20 En la presente invención, se usa ventajosamente un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 como ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4. Además de eso, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que uno o una pluralidad (por ejemplo, varios) de aminoácido(s) se sustituye(n), delecta(n), añade(n) y/o inserta(n), y que también tiene una actividad de intercambiador aniónico SLC4. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de AE1 humano. Aparte de la información de secuencia de AE1 humano, la información del homólogo sobre un ratón, una rata, un chimpancé, una vaca, un caballo, un perro, un lobo, una gallina, un pez cebra, y similares se ha registrado como ratón; GenBank NM\_011403, rata; GeneBank NM\_012651, chimpancé; GenBank XM\_001151353, vaca; GeneBank NM\_181036, caballo; GeneBank NM\_001081788, perro; GenBank AB242566, lobo; GeneBank NM\_001048031, gallina; GenBank NM\_205522 y pez cebra; GenBank NM\_198338. Por tanto, también puede usarse AE1 tal como se describió anteriormente. Otros intercambiadores aniónicos SLC4 también pueden usarse puesto que la información de secuencia de los mismos se ha registrado en diversas bases de datos.

30 El polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 mediante sustitución, delectión, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4 es funcionalmente equivalente a un intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano, ratón, rata, chimpancé, vaca, caballo, perro, lobo, gallina o pez cebra (a continuación en el presente documento denominado en ocasiones "intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar"). Un polipéptido de este tipo engloba, por ejemplo, mutantes del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar. En el ejemplo descrito a continuación, se usó un mutante en el que se reemplazaron cuatro de 911 aminoácidos (L88R, E693G, V712A y H834Y).

40 Como métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico, pueden facilitarse métodos de introducción de mutaciones en polipéptidos. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrían preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar introduciendo apropiadamente mutaciones en aminoácidos del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar mediante mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, y Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. *et al.* (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, y Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492; Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766). También pueden producirse mutaciones en aminoácidos en la naturaleza.

50 Los ejemplos específicos de polipéptidos funcionalmente equivalentes al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar mediante delectión de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar mediante adición de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar mediante sustitución de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos, por otros aminoácidos.

Los residuos de aminoácido que van a mutarse no están particularmente limitados. Preferiblemente, se mutan residuos de aminoácido a otros aminoácidos en los que se conserva la naturaleza de la cadena lateral de

aminoácido inicial. Los ejemplos específicos de la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido incluyen aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), aminoácidos con una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I y P), aminoácidos con una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T y Y), aminoácidos con una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C y M), aminoácidos con una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q), aminoácidos con una cadena lateral que contiene base (R, K y H) y aminoácidos con una cadena lateral que contiene grupo aromático (H, F, Y y W) (entre paréntesis están los códigos de una letra para aminoácidos).

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

Como ejemplo del polipéptido en el que se añaden uno o más residuos de aminoácido al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar, puede facilitarse un polipéptido de fusión que comprende el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar. Un polipéptido de fusión de este tipo se compone del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar y otro polipéptido fusionado al mismo. Un polipéptido de fusión de este tipo puede prepararse mediante ligado de un gen que codifica el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar en marco con un gen que codifica el otro polipéptido, transferencia del ADN resultante a un vector de expresión y expresión del ADN en una célula huésped. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica. No existe ninguna limitación sobre el polipéptido que va a fusionarse al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar.

Los ejemplos de polipéptidos que van a fusionarse al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar incluyen, pero no se limitan a, FLAG (Hopp, T. P. *et al.*, BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6xHis que comprende seis residuos de histidina (His), 10xHis, hemaglutinina (HA) de influenza, fragmento de c-myc humano, fragmento GP de VSV, fragmento de VIH p18, etiqueta de T7, etiqueta de VHS, etiqueta E, fragmento de antígeno SV40T, etiqueta Ick, fragmento de  $\alpha$ -tubulina, etiqueta B, fragmento de proteína C, glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA) de influenza, región constante de inmunoglobulina,  $\beta$ -galactosidasa y proteína de unión a maltosa (MBP).

Un gen disponible comercialmente que codifica tal polipéptido se fusiona al gen que codifica el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar. El gen fusionado así preparado se expresa para preparar un polipéptido fusionado.

Un método alternativo conocido por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico es un método que usa la técnica de hibridación (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning 2ª ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Los expertos en la técnica podrían aislar rutinariamente un ADN altamente homólogo a la secuencia de ADN (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar basándose en esa secuencia de ADN o una parte de la misma, y aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar a partir de ese ADN.

Las condiciones de hibridación para aislar un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar pueden seleccionarse apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden facilitarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad. Condiciones de hibridación de baja rigurosidad son, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden proporcionarse condiciones de alta rigurosidad. Por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad son 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se disminuye la temperatura de hibridación, se obtienen no sólo ADN con alta homología sino también ADN con únicamente baja homología. A la inversa, se espera que se sólo obtengan aquellos ADN con alta homología a medida que se eleva la temperatura de hibridación. Sin embargo, no sólo la temperatura sino también una pluralidad de factores (tales como concentraciones de sal) afectan a la rigurosidad de hibridación. Los expertos en la técnica podrían seleccionar apropiadamente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

El polipéptido codificado por un ADN aislado mediante estas técnicas de hibridación puede tener una homología del 70% o más y habitualmente tiene alta homología con el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar en la secuencia de aminoácidos. El término "alta homología" se refiere habitualmente a una homología del 97% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una homología del 99% o más. Para la determinación de la homología de polipéptidos, puede seguirse el algoritmo descrito en Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730.

El polipéptido puede variar en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la presencia o ausencia de cadenas de azúcar, la morfología, etc. dependiendo de la célula o el huésped que produce el polipéptido o el método de purificación que se describirá más adelante. Sin embargo, siempre que el polipéptido resultante tenga funciones equivalentes a las funciones del intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o

similar, puede usarse un ADN que codifica el polipéptido en la presente invención. Por ejemplo, cuando el polipéptido de la presente invención se expresa en un procarionta (por ejemplo, *Escherichia coli*), se añade un residuo de metionina al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos inicial del polipéptido. Cuando el polipéptido se expresa en un eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero), se elimina la secuencia señal N-terminal. Estos polipéptidos pueden usarse en la presente invención.

En la presente invención, como ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. Alternativamente, puede usarse un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4. SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de AE1 humano. Aparte de la información de secuencia de AE1 humano, la información del homólogo sobre un ratón, una rata, un chimpancé, una vaca, un caballo, un perro, un lobo, una gallina, un pez cebra, y similares se ha registrado como ratón; GenBank NM\_011403, rata; GeneBank NM\_012651, chimpancé; GenBank XM\_001151353, vaca; GeneBank NM\_181036, caballo; GeneBank NM\_001081788, perro; GenBank AB242566, lobo; GeneBank NM\_001048031, gallina; GenBank NM\_205522 y pez cebra; GenBank NM\_198338. Por tanto, también puede usarse AE1 tal como se describió anteriormente. También puede usarse otros intercambiadores aniónicos SLC4 puesto que la información de secuencia de los mismos se ha registrado en diversas bases de datos.

El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede usarse en la producción *in vivo* o *in vitro* de un polipéptido deseado tal como se describió anteriormente. Además, el ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede usarse en la creación de una célula que expresa fuertemente un intercambiador aniónico SLC4. El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede adoptar cualquier forma siempre que pueda codificar un intercambiador aniónico SLC4. Es decir, el ADN puede ser, por ejemplo, un ADNc sintetizado a partir de ARNm, un ADN genómico o un ADN sintetizado químicamente. Debe indicarse que, siempre que el ADN pueda codificar un intercambiador aniónico SLC4, el ADN puede tener cualquier secuencia de nucleótidos basándose en la degeneración de los códigos genéticos.

El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede prepararse mediante la preparación de una biblioteca de ADNc a partir de una célula que expresa un intercambiador aniónico SLC4 y la realización de hibridación usando una parte de la secuencia de ADN de un intercambiador aniónico SLC4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) como sonda. La biblioteca de ADNc puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Alternativamente, puede usarse una biblioteca de ADNc comercial. También es posible preparar el ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 mediante la preparación de ARN a partir de una célula que expresa un intercambiador aniónico SLC4, la síntesis de moléculas de oligo ADN basadas en la secuencia de ADN de un intercambiador aniónico SLC4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y la realización de PCR usando las moléculas de oligo ADN como cebadores para amplificar de ese modo un ADNc que codifica un intercambiador aniónico SLC4.

Además, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc resultante, es posible determinar la región de traducción que codifica un intercambiador aniónico SLC4 y obtener la secuencia de aminoácidos del intercambiador aniónico SLC4. Además, mediante el examen de una biblioteca genómica usando el ADNc resultante como sonda, es posible aislar un ADN genómico.

Específicamente, pueden usarse los siguientes procedimientos. En primer lugar, se aísla ARNm de células, tejidos o similares que expresan un intercambiador aniónico SLC4. Para el aislamiento de ARNm, se prepara el ARN total mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.*, Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el método de AGPC (Chomczynski, P. y Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) o similares, y luego se purifica el ARNm del ARN total usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia), etc. Alternativamente, puede prepararse ARNm directamente usando el kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

A partir del ARNm resultante, se sintetiza ADNc usando una transcriptasa inversa. Alternativamente, puede sintetizarse ADNc usando un kit tal como el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa inversa de VMA (SEIKAGAKU CORPORATION). También es posible sintetizar y amplificar ADNc según el método de 5'-RACE (Frohman, M. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. *et al.*, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) usando el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores.

Se prepara un fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR resultante y se liga a un ADN de vector para preparar de ese modo un vector recombinante. El vector se introduce en un huésped (por ejemplo, *E. coli*), seguido por selección de colonias resultantes para obtener de ese modo un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés puede confirmarse mediante un método conocido tal como el método de terminación de la cadena con didesoxinucleótido.

Además, una secuencia de nucleótidos de mayor eficacia de expresión puede diseñarse para el ADN que codifica un

intercambiador aniónico SLC4 mediante la consideración de la frecuencia de uso de codones en el huésped que va a usarse para la expresión (Grantham, R. *et al.*, Nucleic Acids Research (1981) 9, págs. 43-74). Además, el ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede modificarse usando kits disponibles comercialmente o métodos conocidos. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, digestión con enzimas de restricción, inserción de oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de ADN apropiados, adición de ligadores e inserción de un codón de iniciación (ATG) y/o un codón de terminación (TAA, TGA o TAG).

El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 también incluye un ADN que se hibrida con un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a un intercambiador aniónico SLC4.

Pueden seleccionarse apropiadamente condiciones rigurosas por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, condiciones de baja rigurosidad. Condiciones de baja rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden seleccionarse condiciones de alta rigurosidad. Condiciones de alta rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, pueden obtenerse ADN con una mayor homología. El ADN descrito anteriormente que se hibrida es preferiblemente un ADN derivado de la naturaleza, por ejemplo, ADNc o ADN cromosómico.

Estos ADN aislados mediante técnicas de hibridación tienen habitualmente una alta identidad de secuencia de nucleótidos con un ADN que codifica el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar. El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 también incluye un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar y tiene alta identidad con un ADN que codifica el intercambiador aniónico SLC4 derivado de ser humano o similar. El término "alta identidad" se refiere habitualmente a una homología del 96% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una identidad del 99% o más. La identidad de secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el algoritmo BLAST (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Basándose en este algoritmo, se han desarrollado programas tales como BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos mediante BLASTN basado en BLAST, pueden ajustarse parámetros como puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, por ejemplo. Se conocen procedimientos específicos para estos métodos de análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Un gen de transportador de bicarbonato que va a incorporarse en una célula puede ser un gen de intercambiador aniónico SLC26. La información de una secuencia de nucleótidos de un gen de intercambiador aniónico SLC26 y un aminoácido codificado por el gen se ha registrado como GenBank AF331525 (SLC26A9 de ser humano supuesto), GenBank NM\_052934 (variante 1 de SLC26A9 de ser humano), GenBank NM\_134325 (variante 2 de SLC26A9 de ser humano), GenBank NM\_134420 (SLC26A6 de ratón), GenBank NM\_177243 (SLC26A9 de ratón), GenBank AY240025 (Slc26d9702 de *Drosophila*), GenBank AY240023 (Slc26d6928 de *Drosophila*), GenBank AY240022 (Slc26d6125 de *Drosophila*), GenBank AY240021 (Slc26d5002 de *Drosophila*) y GenBank AB084425 (Slc26A6 de anguila). Por tanto, puede usarse el gen de intercambiador aniónico SLC26 descrito como anteriormente.

El ADN que codifica un intercambiador aniónico SLC4 puede insertarse en un vector.

Cuando la célula huésped que va a usarse es *E. coli*, es preferible que el vector tenga un origen de replicación ("ori") de modo que el vector se amplifique en gran medida en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 y XL1-Blue) y se prepare en gran cantidad, y también genes para seleccionar *E. coli* transformada (por ejemplo, genes de resistencia a fármacos que permiten la discriminación de transformantes con algunos fármacos tales como ampicilina, tetraciclina, kanamicina o cloranfenicol). Los ejemplos de vectores preferibles incluyen, pero no se limitan a, vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Además de estos vectores, pueden enumerarse pGEM-T, pDIRECT, pT7, etc. cuando se usa el vector para el fin de subclonar un ADNc y cortar el ADNc subclonado. Cuando se usa el vector para el fin de producir el polipéptido de la presente invención, un vector de expresión es especialmente útil. Cuando se pretende la expresión en *E. coli*, el vector de expresión tiene preferiblemente las características descritas anteriormente de modo que el vector se amplifica en *E. coli*, y tiene también preferiblemente un promotor que permite la expresión eficaz en *E. coli* tal como JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 o XL1-Blue, por ejemplo, promotor de lacZ (Ward *et al.*, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), promotor de araB (Better *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043) o promotor de T7. Los ejemplos específicos de tal vector incluyen, además de los enumerados anteriormente, pGEX-5X-1 (Pharmacia), el sistema QIAexpress (Qiagen), pEGFP o pET (para su huésped, se prefiere BL21 que expresa ARN polimerasa de T7).

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

En casos en los que se usa una célula huésped distinta de *E. coli*, los vectores útiles para producir un polipéptido deseado incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión derivados de mamífero [por ejemplo, pcDNA3 de Invitrogen; pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 1990, 18(17), pág. 5322); pEF, pCDM8], vectores de expresión derivados

de células de insecto (por ejemplo, el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC de GIBCO BRL; pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZlpneo), vectores de expresión derivados de levaduras (por ejemplo, kit de expresión de *Pichia* de Invitrogen; pNV11; SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608, pKTH50).

Cuando se pretende la expresión del polipéptido en células animales (tales como células CHO, células COS, células NIH3T3, etc.), el vector tiene preferiblemente un promotor necesario para expresar el polipéptido en esas células. Los ejemplos de tal promotor incluyen, pero no se limitan a, promotor de SV40 (Mulligan *et al*, Nature (1979) 277, 108), promotor de LTR de VLMM, promotor de EF1 $\alpha$  (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) y promotor de CMV. Más preferiblemente, el vector tiene también genes para seleccionar células transformadas (por ejemplo, genes de resistencia a fármacos que permiten la discriminación con fármacos tales como neomicina o G418). Los ejemplos de vectores que tienen tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Además, cuando se pretenden la expresión estable de un gen de interés y la amplificación intracelular del número de copias del gen, puede usarse el siguiente método. En resumen, en células CHO que carecen de la ruta de síntesis de ácidos nucleicos, se introduce un vector que tiene el gen de DHFR que complementa la carencia (por ejemplo, pCHOI), seguido por amplificación con metotrexato (MTX). Por otra parte, cuando se pretende la expresión provisional de un gen de interés, puede usarse un método en el que células COS que portan un gen que expresa el antígeno SV40T en el cromosoma con un vector que tiene el origen de replicación de SV40 (por ejemplo, pcD). Como origen de replicación, puede usarse también un origen de replicación derivado de poliomavirus, adenovirus o virus del papiloma bovino (VPB). Además, el vector de expresión puede contener marcadores seleccionables para amplificar el número de copias del gen en un sistema de célula huésped. Los ejemplos de tales marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, gen de aminoglucósido fosfotransferasa (APH), gen de timidina cinasa (TK), gen de xantina-guanina fosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt) y gen de dihidrofolato reductasa (dhfr).

La célula huésped a la que se transfiere el ADN que codifica un transportador de bicarbonato (que puede incorporarse en un vector) no está particularmente limitada. Por ejemplo, puede usarse *E. coli* o diversas células animales. Si se transfiere un ADN que codifica un polipéptido deseado a una célula huésped a la que se transfiere un ADN que codifica un transportador de bicarbonato, esta célula huésped puede expresar fuertemente el transportador de bicarbonato, lo que conduce a un aumento de la producción del péptido deseado. A la célula huésped a la que se transfiere un ADN que codifica un transportador de bicarbonato, puede transferirse además un ADN que codifica CSAD o ALT (que puede incorporarse en un vector). Mediante la transferencia de un ADN que codifica un polipéptido deseado y un ADN que codifica CSAD o ALT a una célula huésped a la que se transfiere un ADN que codifica un transportador de bicarbonato, puede aumentarse el rendimiento del péptido deseado. Para la producción del polipéptido, existen sistemas de producción *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos de sistemas de producción *in vitro* incluyen sistemas que usan eucariotas y sistemas que usan procariotas.

Cuando se produce un polipéptido deseado usando una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de transportador de bicarbonato, el orden de la transferencia de un gen de transportador de bicarbonato y la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado no está particularmente limitado. Un gen que codifica un polipéptido deseado puede transferirse después de la transferencia de un gen de transportador de bicarbonato. Alternativamente, un gen de transportador de bicarbonato puede transferirse después de la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado. También es posible transferir simultáneamente un gen de transportador de bicarbonato y un gen que codifica un polipéptido deseado.

Un gen de transportador de bicarbonato y un gen que codifica un polipéptido deseado pueden transferirse simultáneamente en un único vector. Alternativamente, pueden transferirse por separado usando una pluralidad de vectores.

Preferiblemente, la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato expresa además fuertemente ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa (CSAD) o alanina aminotransferasa (ALT) con el fin de preparar un polipéptido deseado. Mediante la transferencia de un gen que codifica el péptido deseado a la célula y el cultivo de la célula resultante en un medio, puede producirse el péptido deseado en una mayor cantidad.

CSAD se conoce originariamente como una enzima que convierte ácido alanina-3-sulfínico en hipotaurina. Si se expresa fuertemente ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa en una célula CHO, la célula sintetiza una cantidad en exceso de  $\beta$ -alanina.

Una célula que expresa fuertemente CSAD no está particularmente limitada siempre que la célula tenga un nivel de expresión aumentado de CSAD en comparación con una célula natural correspondiente. La célula natural no está particularmente limitada. Puede usarse una célula que se usa como huésped en la producción de una proteína recombinante (por ejemplo, células CHO).

Como CSAD que va a expresarse fuertemente en una célula, puede usarse CSAD derivada de cualquier organismo. Específicamente, CSAD derivada de ser humano, un roedor (tal como ratón, rata o hámster), un pez globo (tal como

pez globo tigre) o una ascidia (tal como *Ciona intestinalis*). Preferiblemente, puede usarse CSAD derivada de ser humano, un roedor o la misma especie que la célula huésped. Por ejemplo, cuando la célula que se permite que exprese fuertemente CSAD son células de ovario de hámster chino (células CHO), la CSAD se deriva preferiblemente de ser humano o hámster.

5 Como célula que expresa fuertemente CSAD, puede proporcionarse una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de CSAD. Una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de CSAD puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una célula de este tipo puede prepararse incorporando un gen de CSAD en un vector y transformando el vector en una célula. Además, el concepto de “células a las que se ha transferido artificialmente un gen de CSAD” engloba en el presente documento  
10 células en las que se ha activado un gen de CSAD endógeno mediante tecnología de activación génica (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO94/12650) de modo que se expresa fuertemente CSAD.

Como gen de CSAD que va a transferirse a una célula, puede usarse uno cualquiera de los siguientes ADN (a1) a (e1).

15 (a1) Un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600);

20 (b1) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600) mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de CSAD;

25 (c1) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 70% o más con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600) y que aún tiene actividad de CSAD;

(d1) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos de GenBank CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD de ser humano NM\_015989;

30 (e1) un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos de GenBank CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD de ser humano NM\_015989 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de CSAD.

El concepto de una actividad de CSAD engloba la actividad de catalizar 3-sulfino-L-alanina = hipotaurina + CO<sub>2</sub> para la descarboxilación. Tiene también la actividad de descarboxilar ácido L-cisteico. (Número EC 4.1.1.29).

35 La actividad de CSAD puede medirse de la siguiente manera. Tal como se enseña por Davis K. *et al.*, J Biomed Sci 2001; 8:359-364, se cuantifica el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producido a partir de ácido L-[1-<sup>14</sup>C]cisteico por la actividad descarboxilasa de CSAD.

40 En la presente invención, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600) como ADN que codifica CSAD. Además de eso, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600) en la que uno o una pluralidad de aminoácido(s) se sustituye(n), deleciona(n), añade(n) y/o inserta(n), y que también tiene actividad de CSAD.

45 El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600) en el que uno o una pluralidad de aminoácido(s) se sustituye(n), deleciona(n), añade(n) y/o inserta(n), y que también tiene actividad de CSAD es funcionalmente equivalente a CSAD derivada de hámster, rata, ratón o ser humano (a continuación en el presente documento denominada en ocasiones “CSAD derivada de hámster o similar”).  
50 Un polipéptido de este tipo engloba, por ejemplo, mutantes de CSAD derivada de hámster o similar.

Como métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico, pueden facilitarse métodos de introducción de mutaciones en polipéptidos. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrían preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a CSAD derivada de hámster o similar introduciendo apropiadamente mutaciones en aminoácidos de CSAD derivada de hámster o similar mediante mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, y Smith, M (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. *et al.* (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, y Fritz HJ

(1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol* 85, 2763-2766). También pueden producirse mutaciones en aminoácidos en la naturaleza.

5 Los ejemplos específicos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a CSAD derivada de hámster o similar incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de CSAD derivada de hámster o similar (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot y TrEMBL) CSAD de rata (Q64611), CSAD de ratón (Q9DBE0) o CSAD de ser humano (Q9Y600)) mediante delección de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de CSAD derivada de hámster o similar mediante adición de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de CSAD derivada de hámster o similar mediante sustitución de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos, por otros aminoácidos.

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

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

25 Como ejemplo del polipéptido en el que se añaden uno o más residuos de aminoácido a CSAD derivada de hámster o similar, puede facilitarse un polipéptido de fusión que comprende CSAD derivada de hámster o similar. Un polipéptido de fusión de este tipo se compone de CSAD derivada de hámster o similar y otro polipéptido fusionado a la misma. Un polipéptido de fusión de este tipo puede prepararse mediante ligado de un gen que codifica CSAD derivada de hámster o similar en marco con un gen que codifica el otro polipéptido, transferencia del ADN resultante a un vector de expresión y expresión del ADN en una célula huésped. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica. No existe ninguna limitación sobre el polipéptido que va a fusionarse a CSAD derivada de hámster o similar.

30 Los ejemplos de polipéptidos que van a fusionarse a CSAD derivada de hámster o similar incluyen, pero no se limitan a, FLAG (Hopp, T. P. *et al.*, *BioTechnology* (1988) 6, 1204-1210), 6xHis que comprende seis residuos de histidina (His), 10xHis, hemaglutinina de influenza (HA), fragmento de c-myc humano, fragmento GP de VSV, fragmento de VIH p18, etiqueta de T7, etiqueta de VHS, etiqueta E, fragmento de antígeno SV40T, etiqueta Ick, fragmento de  $\alpha$ -tubulina, etiqueta B, fragmento de proteína C, glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA) de influenza, región constante de inmunoglobulina,  $\beta$ -galactosidasa y proteína de unión a maltosa (MBP).

35 Se fusiona un gen disponible comercialmente que codifica tal polipéptido al gen que codifica CSAD derivada de hámster o similar. El gen fusionado así preparado se expresa para preparar un polipéptido fusionado.

40 Un método alternativo conocido por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico es un método que usa la técnica de hibridación (Sambrook, J *et al.*, *Molecular Cloning* 2<sup>a</sup> ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Los expertos en la técnica podrían aislar rutinariamente un ADN altamente homólogo a la secuencia de ADN de CSAD derivada de hámster o similar (por ejemplo, la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3 o la secuencia de ADN de GenBank CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD de ser humano NM\_015989), basándose en esa secuencia de ADN o una parte de la misma, y aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes a CSAD derivada de hámster o similar a partir de ese ADN.

45 Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente condiciones de hibridación para aislar un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a CSAD derivada de hámster o similar. Por ejemplo, pueden facilitarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad. Condiciones de hibridación de baja rigurosidad son, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden facilitarse condiciones de alta rigurosidad. Por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad son 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se disminuye la temperatura de hibridación, se obtienen no sólo ADN con alta homología sino también ADN con únicamente baja homología. A la inversa, se espera que sólo se obtengan aquellos ADN con alta homología a medida que se eleva la temperatura de hibridación. Sin embargo, no sólo la

temperatura sino también una pluralidad de factores (tales como concentraciones de sal) afectan a la rigurosidad de hibridación. Los expertos en la técnica podrían seleccionar apropiadamente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

5 El polipéptido codificado por un ADN aislado mediante estas técnicas de hibridación puede tener una homología del 70% o más y tiene habitualmente alta homología con CSAD derivada de hámster o similar en la secuencia de aminoácidos. El término "alta homología" se refiere habitualmente a una homología del 97% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una homología del 99% o más. Para la determinación de la homología de polipéptidos, puede seguirse el algoritmo descrito en Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730.

10 El polipéptido puede variar en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la presencia o ausencia de cadenas de azúcar, la morfología, etc. dependiendo de la célula o el huésped que produce el polipéptido o el método de purificación que se describirá más adelante. Sin embargo, siempre que el polipéptido resultante tenga funciones equivalentes a las funciones de CSAD derivada de hámster o similar, puede usarse un ADN que codifica el polipéptido en la presente invención. Por ejemplo, cuando el polipéptido se expresa en un procarionta (por ejemplo, *Escherichia coli*), se añade un residuo de metionina al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos inicial del polipéptido. Cuando el polipéptido se expresa en un eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero), se elimina la secuencia señal N-terminal. Puede usarse un ADN que codifica un polipéptido de este tipo en la presente invención.

20 En la presente invención, un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o las secuencias de nucleótidos de GenBank de CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD humana NM\_015989 puede usarse como ADN que codifica CSAD. Además de eso, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que se hibrida con un ADN complementario a ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o las secuencias de nucleótidos de GenBank de CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD humana NM\_015989 en condiciones rigurosas, y también que tiene actividad de CSAD.

25 El ADN que codifica CSAD se usa para preparar una célula que expresa fuertemente CSAD y después de eso se usa en la producción *in vivo* o *in vitro* de un polipéptido deseado tal como se describió anteriormente. El ADN que codifica CSAD puede adoptar cualquier forma siempre que pueda codificar CSAD. Es decir, el ADN puede ser, por ejemplo, un ADNc sintetizado a partir de ARNm, un ADN genómico o un ADN sintetizado químicamente. Debe indicarse que, siempre que el ADN pueda codificar CSAD, el ADN puede tener cualquier secuencia de nucleótidos basándose en la degeneración de los códigos genéticos.

30 El ADN que codifica CSAD puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede prepararse mediante la preparación de una biblioteca de ADNc de una célula que expresa CSAD y la realización de la hibridación usando una parte de la secuencia de ADN de CSAD (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos de GenBank de CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD humana NM\_015989) como sonda. La biblioteca de ADNc puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Alternativamente, puede usarse una biblioteca de ADNc comercial. También es posible preparar el ADN que codifica CSAD mediante la preparación de ARN de una célula que expresa CSAD, la síntesis de moléculas de oligo-ADN basadas en la secuencia de ADN de CSAD (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos de GenBank de CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD humana NM\_015989), y la realización de PCR usando las moléculas de oligo-ADN como cebadores para amplificar de ese modo un ADNc que codifica CSAD.

45 Además, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc resultante, es posible determinar la región de traducción que codifica el polipéptido y obtener la secuencia de aminoácidos de CSAD. Además, mediante el examen de una biblioteca genómica usando el ADNc resultante como sonda, es posible aislar un ADN genómico.

50 Específicamente, pueden usarse los siguientes procedimientos. En primer lugar, se aísla ARNm de células, tejidos o similares que expresan CSAD. Para el aislamiento de ARNm, se prepara el ARN total mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.*, Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el método de AGPC (Chomczynski, P. y Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) o similar, y entonces se purifica el ARNm a partir del ARN total usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia), etc. Alternativamente, puede prepararse ARNm directamente usando el kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

55 A partir del ARNm resultante, se sintetiza ADNc usando una transcriptasa inversa. Alternativamente, puede sintetizarse ADNc usando un kit tal como el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa inversa de VMA (SEIKAGAKU CORPORATION). También es posible sintetizar y amplificar ADNc según el método de 5'-RACE (Frohman, M. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. *et al.*, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) usando el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores.

Se prepara un fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR resultante y se liga a un ADN de vector para preparar de ese modo un vector recombinante. El vector se introduce en un huésped (por ejemplo, *E. coli*), seguido por selección de las colonias resultantes para obtener de ese modo un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés puede confirmarse mediante un método conocido tal como el método de terminación de la cadena con didesoxinucléotido.

Además, una secuencia de nucleótidos de una mayor eficacia de expresión puede diseñarse para el ADN que codifica CSAD mediante la consideración de la frecuencia de uso de codones en el huésped que va a usarse para la expresión (Grantham, R. *et al.*, *Nucleic Acids Research* (1981) 9, págs. 43-74). Además, el ADN que codifica CSAD puede modificarse usando kits disponibles comercialmente o métodos conocidos. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, digestión con enzimas de restricción, inserción de oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de ADN apropiados, adición de ligadores e inserción de un codón de iniciación (ATG) y/o un codón de terminación (TAA, TGA o TAG).

El ADN que codifica CSAD también incluye un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos de GenBank de CSAD de rata NM\_021750, CSAD de ratón NM\_144942 o CSAD humana NM\_015989 en condiciones rigurosas y codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a CSAD.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente condiciones rigurosas, incluyendo, por ejemplo, condiciones de baja rigurosidad. Condiciones de baja rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden seleccionarse condiciones de alta rigurosidad. Condiciones de alta rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, pueden obtenerse ADN con una mayor homología. El ADN descrito anteriormente que se hibrida es preferiblemente un ADN derivado de la naturaleza, por ejemplo, ADNc o ADN cromosómico.

Estos ADN aislados mediante técnicas de hibridación tienen habitualmente una alta identidad de la secuencia de nucleótidos con un ADN que codifica CSAD derivada de hámster o similar. El ADN que codifica CSAD también incluye un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a CSAD derivada de hámster o similar y tiene alta identidad con un ADN que codifica CSAD derivada de hámster o similar. El término "alta identidad" se refiere habitualmente a una homología del 96% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una identidad del 99% o más. La identidad de secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el algoritmo BLAST (Karlin y Altschul., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, 1993). Basándose en este algoritmo, se han desarrollado programas tales como BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.* *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos mediante BLASTN basado en BLAST, pueden ajustarse parámetros como puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, por ejemplo. Se conocen procedimientos específicos para estos métodos de análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

ALT se conoce fundamentalmente como una enzima que produce glutamato mediante la transferencia de un grupo amino de alanina a 2-oxoglutarato. Si la reacción de biosíntesis de piruvato y glutamato a partir de alanina pudiese promoverse mediante la fuerte expresión de ALT en células huésped tales como células CHO, los productos podrían utilizarse en el metabolismo durante un ciclo de TCA y la producción de glucosa mediante glucogénesis, y esto podría mejorar el comportamiento en cultivo celular, conduciendo a una producción de alto rendimiento del péptido deseado.

Las células con fuerte expresión de ALT no están particularmente limitadas siempre que puedan producir expresión de ALT a mayores niveles que las células naturales. Las células naturales incluyen, pero no se limitan particularmente a, células que se usan como huéspedes en la producción de proteínas recombinantes y pueden ejemplificarse mediante células CHO.

Como célula que expresa fuertemente ALT, puede facilitarse una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de ALT. Puede prepararse una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de ALT mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede prepararse una célula de este tipo mediante la incorporación de un gen de ALT en un vector y la transformación del vector en una célula. Además, el concepto de "células a las que se ha transferido artificialmente un gen de ALT" engloba en el presente documento células en las que se ha activado un gen de ALT endógeno mediante tecnología de activación génica (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO94/12650) de modo que se expresa fuertemente ALT.

Como ALT que va a expresarse fuertemente en una célula, puede usarse ALT derivada de cualquier organismo. Específicamente, se conocen y pueden usarse ALT derivadas de ser humano, ratón, rata, perro, rana africana de uñas, mosca de la fruta, nematodo, arroz japonés, *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Dictyostelium discoideum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi*. Preferiblemente, puede usarse ALT derivada de ser humano, un roedor o la misma especie que las células huésped. Por ejemplo, cuando la célula que se permite que exprese fuertemente ALT son células de ovario de hámster chino (células CHO), ALT se deriva preferiblemente de ser humano o hámster. Para

ALT en seres humanos, ratones y levaduras, existen variantes (ALT1 y ALT2). ALT2 tiene una homología del 80% o mayor con ALT1 a nivel de aminoácidos. Se expresó ALT de manera forzada en los ejemplos y ejemplos de referencia descritos más adelante.

5 Como gen de ALT que va a expresarse fuertemente en una célula, puede usarse uno cualquiera de los siguientes ADN (a2) a (e2) que codifican ALT.

(a2) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140;

25 (b2) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140 mediante sustitución, 45 delección, adición y/o inserción de uno o más (por ejemplo, varios) residuos de aminoácido y aún tiene actividad de ALT;

(c2) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 70% o más con la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA:

2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140 y aún que tiene actividad de ALT;

(d2) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140;

(e2) un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de ALT.

El concepto de una actividad de ALT engloba una actividad enzimática para catalizar la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un  $\alpha$ -cetoácido.

La actividad de ALT puede medirse de la siguiente manera.

45 El nivel de actividad de ALT se determina mediante un reactivo para analizador automatizado para medir la alanina aminotransferasa (líquido de Rumpia S-ALT, número de aprobación 20900AMZ00597000) y el método enseñado por Rajamohan F. et. al., Protein Expression and Purification (2006) 48, 81-89.

En la presente invención, como gen que codifica ALT, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490,

KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140. Alternativamente, puede usarse un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de ALT.

El polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140 mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de ALT es funcionalmente equivalente a ALT derivada de ser humano, ratón, rata, perro, rana africana de uñas, mosca de la fruta, nematodo, arroz japonés, *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Dictyostelium discoideum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Entamoeba histolytica* o *Trypanosoma cruzi* (a continuación en el presente documento denominada en ocasiones "ALT derivada de ser humano o similar"). Un polipéptido de este tipo engloba, por ejemplo, mutantes de ALT derivada de ser humano o similar. En los ejemplos y ejemplos de referencia descritos más adelante, se usó un mutante en el que se sustituyeron cuatro de 496 aminoácidos (R53S, Q72R, F286S y M332K).

Como métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico, pueden facilitarse métodos de introducción de mutaciones en polipéptidos. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrían preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a ALT derivada de ser humano o similar mediante la introducción apropiada de mutaciones en aminoácidos de ALT derivada de ser humano o similar mediante mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W y Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766). También pueden producirse mutaciones en aminoácidos en la naturaleza.

Los ejemplos específicos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a la ALT derivada de ser humano o similar incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC58208, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG /

- ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140) de la ALT derivada de ser humano o similar mediante delección de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la ALT derivada de ser humano o similar mediante adición de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos; y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la ALT derivada de ser humano o similar mediante sustitución de uno o más aminoácidos, preferiblemente 1-30 aminoácidos, más preferiblemente 1-10 aminoácidos, por otros aminoácidos.
- Los residuos de aminoácido que van a mutarse no están particularmente limitados. Preferiblemente, se mutan residuos de aminoácido a otros aminoácidos en los que se conserva la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido inicial. Los ejemplos específicos de la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido incluyen aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), aminoácidos con una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I y P), aminoácidos con una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T e Y), aminoácidos con una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C y M), aminoácidos con una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q), aminoácidos con una cadena lateral que contiene base (R, K y H) y aminoácidos con una cadena lateral que contiene grupo aromático (H, F, Y y W) (entre paréntesis están los códigos de una letra para aminoácidos).
- Se ha notificado que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original mediante modificación (tal como delección, adición y/o sustitución de uno o más aminoácidos) mantiene la actividad biológica del polipéptido original (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. *et al.*, Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).
- Como ejemplo del polipéptido en el que se añaden uno o más residuos de aminoácido a la ALT derivada de ser humano o similar, puede facilitarse un polipéptido de fusión que comprende la ALT derivada de ser humano o similar. Un polipéptido de fusión de este tipo se compone de la ALT derivada de ser humano o similar y otro polipéptido fusionado al mismo. Un polipéptido de fusión de este tipo puede prepararse mediante ligado de un gen que codifica la ALT derivada de ser humano o similar en marco con un gen que codifica el otro polipéptido, transferencia del ADN resultante a un vector de expresión y expresión del ADN en una célula huésped. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica. No existe ninguna limitación sobre el polipéptido que va a fusionarse a la ALT derivada de ser humano o similar.
- Los ejemplos de polipéptidos que van a fusionarse a la ALT derivada de ser humano o similar incluyen, pero no se limitan a, FLAG (Hopp, T P. *et al.*, BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6xHis que comprende seis residuos de histidina (His), 10xHis, hemaglutinina (HA) de influenza, fragmento c-myc humano, fragmento GP de VSV, fragmento de VIH p18, etiqueta de T7, etiqueta de VSH, etiqueta E, fragmento de antígeno SV40T, etiqueta de Ick, fragmento de  $\alpha$ -tubulina, etiqueta B, fragmento de proteína C, glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA) de influenza, región constante de inmunoglobulina,  $\beta$ -galactosidasa y proteína de unión a maltosa (MBP).
- Un gen disponible comercialmente que codifica tal polipéptido se fusiona al gen que codifica la ALT derivada de ser humano o similar. El gen fusionado así preparado se expresa para preparar un polipéptido fusionado.
- Un método alternativo conocido por los expertos en la técnica para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a un polipéptido específico es un método que usa la técnica de hibridación (Sambrook, J *et al.*, Molecular Cloning 2ª ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Los expertos en la técnica podrían aislar de manera rutinaria un ADN altamente homólogo a la secuencia de ADN (por ejemplo, la secuencia de ADN de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA; 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140) de la ALT derivada

de ser humano o similar basada en esa secuencia de ADN o una parte de la misma, y aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes a la ALT derivada de ser humano o similar a partir de ese ADN.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente las condiciones de hibridación para aislar un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a la ALT derivada de ser humano o similar. Por ejemplo, pueden facilitarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad. Condiciones de hibridación de baja rigurosidad son, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden facilitarse condiciones de alta rigurosidad. Por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad son 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se disminuye la temperatura de hibridación, no sólo se obtienen ADN con alta homología sino también ADN con únicamente baja homología. A la inversa, se espera que sólo se obtengan aquellos ADN con alta homología a medida que se eleva la temperatura de hibridación. Sin embargo, no sólo la temperatura sino también una pluralidad de factores (tales como concentraciones de sal) afectan a la rigurosidad de hibridación. Los expertos en la técnica podrían seleccionar apropiadamente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

El polipéptido codificado por un ADN aislado mediante estas técnicas de hibridación puede tener una homología del 70% o más y tiene habitualmente alta homología con la ALT derivada de ser humano o similar en la secuencia de aminoácidos. El término "alta homología" se refiere habitualmente a una homología del 97% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una homología del 99% o más. Para la determinación de la homología de polipéptidos, puede seguirse el algoritmo descrito en Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730.

El polipéptido puede variar en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la presencia o ausencia de cadenas de azúcar, la morfología, etc. dependiendo de la célula o el huésped que produce el polipéptido o el método de purificación que se describirá más adelante. Sin embargo, siempre que el polipéptido resultante tenga funciones equivalentes a las funciones de la ALT derivada de ser humano o similar, puede usarse un ADN que codifica el polipéptido en la presente invención. Por ejemplo, cuando el polipéptido de la presente invención se expresa en un procarionta (por ejemplo, *Escherichia coli*), se añade un residuo de metionina al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos inicial del polipéptido. Cuando el polipéptido se expresa en un eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero), se elimina la secuencia señal N-terminal. Puede usarse un ADN que codifica un polipéptido de este tipo en la presente invención.

En la presente invención, como ADN que codifica ALT, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO09003000164, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140. Alternativamente, puede usarse un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de ALT.

El ADN que codifica ALT puede usarse en la producción *in vivo* o *in vitro* de un polipéptido deseado tal como se describió anteriormente. Además, el ADN que codifica ALT puede usarse en la creación de una célula que expresa fuertemente ALT. El ADN que codifica ALT puede adoptar cualquier forma siempre que pueda codificar ALT. Es decir, el ADN puede ser, por ejemplo, un ADNc sintetizado a partir de ARNm, un ADN genómico o un ADN sintetizado químicamente. Debe observarse que, siempre que el ADN pueda codificar ALT, el ADN puede tener cualquier secuencia de nucleótidos basándose en la degeneración de los códigos genéticos.

El ADN que codifica ALT puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede prepararse mediante la preparación de una biblioteca de ADNc de una célula que expresa ALT y la realización de hibridación usando una parte de la secuencia de ADN de ALT (por ejemplo, la secuencia de ADN de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis*

- 5 *familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140) como sonda. La biblioteca de ADNc puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Alternativamente, puede usarse una biblioteca de ADNc comercial. También es posible preparar el ADN que codifica ALT mediante la preparación de ARN a partir de una célula que expresa ALT, la síntesis de moléculas de oligo-ADN basadas en la secuencia de ADN de ALT (por ejemplo, la secuencia de ADN de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140), y la realización de PCR usando las moléculas de oligo-ADN como cebadores para amplificar de ese modo un ADNc que codifica ALT.
- 40 Además, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc resultante, es posible determinar la región de traducción que codifica ALT y obtener la secuencia de aminoácidos de ALT. Además, mediante el examen de una biblioteca genómica usando el ADNc resultante como sonda, es posible aislar un ADN genómico.
- 45 Específicamente, pueden usarse los siguientes procedimientos. En primer lugar, se aísla ARNm a partir de células, tejidos o similares que expresan ALT. Para el aislamiento de ARNm, se prepara el ARN total mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.*, *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299), el método de AGPC (Chomczynski, P. y Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159) o similar, y entonces se purifica el ARNm a partir del ARN total usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia), etc. Alternativamente, puede prepararse ARNm directamente usando el kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).
- 50 A partir del ARNm resultante, se sintetiza ADNc usando una transcriptasa inversa. Alternativamente, puede sintetizarse ADNc usando un kit tal como el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa inversa de VMA (SEIKAGAKU CORPORATION). También es posible sintetizar y amplificar ADNc según el método de 5'-RACE (Frohman, M. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) usando el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores.
- 55 Se prepara un fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR resultante y se liga a un ADN de vector para preparar de ese modo un vector recombinante. El vector se introduce en un huésped (por ejemplo, *E. coli*), seguido por selección de las colonias resultantes para obtener de ese modo un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés puede confirmarse mediante un método conocido tal como el método de terminación de la cadena con didesoxinucléotido.
- 60 Además, una secuencia de nucleótidos de mayor eficacia de expresión puede diseñarse para el ADN que codifica ALT mediante la consideración de la frecuencia de uso de codones en el huésped que va a usarse para la expresión

(Grantham, R. *et al.*, Nucleic Acids Research (1981) 9, págs. 43-74). Además, el ADN que codifica ALT puede modificarse usando kits disponibles comercialmente o métodos conocidos. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, digestión con enzimas de restricción, inserción de oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de ADN apropiados, adición de ligadores e inserción de un codón de iniciación (ATG) y/o un codón de terminación (TAA, TGA o TAG).

El ADN que codifica ALT también incluye un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 84706, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 76282, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (ratón): 108682, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rata): 81670, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (perro): 609510, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (rana africana de uñas): 444533, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Dmel\_CG1640, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematodo): C32F10.8, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4342210, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (arroz japonés): 4348524, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS\_AGR085W, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19\_346, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA\_6G07770, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: A0090003000164, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB\_0232139, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 o KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140 en condiciones rigurosas y codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a ALT.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente condiciones rigurosas, incluyendo, por ejemplo, condiciones de baja rigurosidad. Condiciones de baja rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 42°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente 50°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. Más preferiblemente, pueden seleccionarse condiciones de alta rigurosidad. Condiciones de alta rigurosidad se refieren a, por ejemplo, 65°C, 2 x SSC y SDS al 0,1%. En estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, pueden obtenerse ADN con una mayor homología. El ADN descrito anteriormente que se hibrida es preferiblemente un ADN derivado de la naturaleza, por ejemplo, ADNc o ADN cromosómico.

Estos ADN aislados mediante técnicas de hibridación tienen habitualmente una alta identidad de la secuencia de nucleótidos con un ADN que codifica la ALT derivada de ser humano o similar. El ADN que codifica ALT también incluye un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a la ALT derivada de ser humano o similar y tiene alta identidad con un ADN que codifica la ALT derivada de ser humano o similar. El término "alta identidad" se refiere habitualmente a una homología del 96% o más, preferiblemente una homología del 98% o más, más preferiblemente una identidad del 99% o más. La identidad de secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el algoritmo BLAST (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Basándose en este algoritmo, se han desarrollado programas tales como BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos mediante BLASTN basado en BLAST, pueden ajustarse parámetros como puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, por ejemplo. Se conocen procedimientos específicos para estos métodos de análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La producción de un polipéptido deseado puede realizarse mediante la transferencia de un gen que codifica el péptido deseado en una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato y CSAD o ALT y el cultivo de la célula resultante en un medio.

Cuando se produce un polipéptido deseado usando una célula a la que se ha transferido artificialmente un gen de transportador de bicarbonato y un gen de CSAD o ALT, no está particularmente limitado el orden de la transferencia de un gen de transportador de bicarbonato, la transferencia de un gen de CSAD y la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado. Un gen que codifica un polipéptido deseado pueden transferirse tras la transferencia de un gen de transportador de bicarbonato y un gen de CSAD o ALT. Alternativamente, un gen de transportador de bicarbonato y un gen de CSAD o ALT pueden transferirse tras la transferencia de un gen que codifica un polipéptido deseado. También es posible transferir un gen de transportador de bicarbonato, un gen de CSAD o ALT y un gen que codifica un polipéptido deseado simultáneamente.

Un gen de transportador de bicarbonato, un gen de CSAD o ALT y un gen que codifica un polipéptido deseado pueden transferirse simultáneamente en un único vector. Alternativamente, pueden transferirse por separado usando una pluralidad de vectores.

Para cultivar la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato (y que puede expresar fuertemente CSAD o ALT), pueden usarse medios usados en cultivo celular convencional (preferiblemente, cultivo de células animales). Estos medios contienen habitualmente aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía,

reguladores osmóticos, fuentes de hierro y reguladores del pH. Los contenidos de estos componentes son habitualmente los siguientes: aminoácidos 0,05-1500 mg/l, vitaminas 0,001-10 mg/l, factores lipídicos 0-200 mg/l, fuentes de energía 1-20 g/l, reguladores osmóticos 0,1-10000 mg/l, fuentes de hierro 0,1-500 mg/l, reguladores del pH 1-10000 mg/l, oligoelementos metálicos 0,00001-200 mg/l, tensioactivos 0-5000 mg/l, cofactores de crecimiento 0,05-10000 mg/l y nucleósidos 0,001-50 mg/l. Sin embargo, los contenidos no se limitan a estos intervalos y pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo de la célula que va a cultivarse, el tipo del péptido deseado, etcétera.

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

Los ejemplos específicos de tales componentes incluyen aminoácidos, tales como L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, preferiblemente, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; vitaminas, tales como i-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipóico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B<sub>12</sub> y ácido ascórbico, preferiblemente, biotina, ácido fólico, ácido lipóico, nicotinamida, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B<sub>12</sub> y ácido ascórbico; factores lipídicos, tales como cloruro de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico y colesterol, preferiblemente, cloruro de colina; fuentes de energía, tales como glucosa, galactosa, manosa y fructosa, preferiblemente, glucosa, reguladores osmóticos, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y nitrato de potasio, preferiblemente, cloruro de sodio; fuentes de hierro, tales como EDTA de hierro, citrato férrico, cloruro ferroso, cloruro férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico y nitrato férrico, preferiblemente, cloruro férrico, EDTA de hierro y citrato férrico; y reguladores del pH, tales como hidrogenocarbonato de sodio, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio, HEPES y MOPS, preferiblemente, hidrogenocarbonato de sodio. Pueden facilitarse como ejemplos medios de cultivo que contienen cualquiera de estos componentes.

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

El pH del medio varía dependiendo de la célula que va a cultivarse. Generalmente, es apropiado pH 6,8-7,6. En muchos casos, es apropiado pH 7,0-7,4.

También es posible usar un medio comercial para cultivo de células animales, por ejemplo, D-MEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), mezcla 1:1 de D-MEM/F-12 (medio de Eagle modificado por Dulbecco : mezcla de nutrientes F-12), RPMI1640, CHO-SSFMII (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH Biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific), PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich) o similar.

Alternativamente, el medio puede ser un medio libre de suero.

Cuando la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato (y que puede expresar fuertemente CSAD o ALT) son células CHO, pueden cultivarse las células CHO mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden cultivarse células CHO habitualmente en un atmósfera con una concentración de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa del 0 al 40%, preferiblemente del 2 al 10%, a de 30 a 39°C, preferiblemente a aproximadamente 37°C.

Un periodo de cultivo apropiado para producir un polipéptido deseado usando la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato (y que puede expresar fuertemente CSAD o ALT) es habitualmente de 1 día a 3 meses, preferiblemente de 1 día a 2 meses, más preferiblemente de 1 día a 1 mes.

Con respecto a diversos dispositivos de cultivo para cultivo de células animales, puede usarse un dispositivo de cultivo en tanque del tipo de fermentador, un dispositivo de cultivo del tipo de accionamiento por aire, un dispositivo de cultivo del tipo de matraz de cultivo, un dispositivo de cultivo del tipo de matraz de agitación, un dispositivo de cultivo del tipo de microportador, un dispositivo de cultivo del tipo de lecho fluidizado, un dispositivo de cultivo del tipo de fibra hueca, un dispositivo de cultivo del tipo de frasco rotatorio, un dispositivo de cultivo del tipo de lecho compacto, o similar.

El cultivo puede realizarse mediante cualquier método de cultivo tal como cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo o

cultivo continuo. Preferiblemente, se usa cultivo semicontinuo o cultivo continuo. Se prefiere más el cultivo semicontinuo.

5 Cuando el polipéptido producido según el método de la presente invención tiene una actividad biológica útil como producto farmacéutico, es posible producir un producto farmacéutico mediante el mezclado de este polipéptido con portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables y la formulación en una preparación.

10 Los ejemplos específicos de portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, disolventes orgánicos que son farmacéuticamente aceptables, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetil-almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, agar-agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, y tensioactivos que son aceptables como aditivos farmacéuticos.

15 Los aditivos reales pueden seleccionarse de los aditivos mencionados anteriormente individualmente o en combinación según la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención, pero no se limitan a los enumerados anteriormente. Por ejemplo, cuando se usa un polipéptido en una formulación inyectable, el polipéptido purificado puede disolverse en un disolvente tal como solución salina fisiológica, tampón o una disolución de glucosa, y luego puede añadirse un inhibidor de la adsorción tal como Tween 80, Tween 20, gelatina o albúmina sérica humana a la disolución. Alternativamente, puede usarse un agente liofilizado para preparar una forma de dosificación que se disuelve y se reconstituye antes de su uso. Los ejemplos del excipiente útil para liofilización incluyen alcoholes de azúcar y sacáridos tales como manitol y glucosa.

20 Pueden seleccionarse apropiadamente dosis eficaces del polipéptido dependiendo del tipo del polipéptido, el tipo de la enfermedad que va a tratarse o prevenirse, la edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. Por ejemplo, cuando el polipéptido es anticuerpo anti-glipicano, la dosis eficaz de anticuerpo anti-glipicano se selecciona dentro de un intervalo de 0,001 mg a 1000 mg per kg de peso corporal por administración. Alternativamente, puede seleccionarse una dosis de 0,01-100000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, la dosis eficaz no se limita a estos intervalos.

El polipéptido puede administrarse o bien por vía oral o bien por vía parenteral, pero se prefiere la administración parenteral. Específicamente, pueden enumerarse inyección (por ejemplo, administración sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, etc.), administración transnasal, administración transpulmonar, administración transdérmica y similares.

30 La presente invención proporciona una célula que tiene un ADN transferido que codifica un transportador de bicarbonato y un ADN transferido que codifica cisteína-ácido sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa, pudiendo ambos o cualquiera de ellos incorporarse en un vector.

35 Cuando se usan eucariotas, pueden usarse células animales, células vegetales, células fúngicas, etc. como huésped. Los ejemplos específicos de células animales incluyen células de mamífero, tales como células CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), células COS, células 3T3, células de mieloma BHK (riñón de hámster recién nacido), células HeLa y células Vero; células de anfibio, tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al*, Nature (1981) 291, 358-340); o células de insecto, tales como células sf9, sf21 y Tn5. Entre las células CHO, se usan el gen de DHFR que carece de dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4420) y CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) con ventaja particular. Cuando se pretende una alta expresión en una célula animal, se prefieren especialmente células CHO. La introducción del ADN que puede incorporarse en un vector en la célula huésped puede realizarse mediante métodos tales como el método de fosfato de calcio, el método de DEAE-dextrano, un método que usa un DOTAP ribosómico catiónico (Boehringer-Mannheim), electroporación, lipofección, etc.

45 Como células vegetales para la producción de polipéptidos, se conoce una célula derivada de *Nicotiana tabacum* como sistema de producción de polipéptidos y esto puede someterse a cultivo en callo. Como células fúngicas para la producción de polipéptidos, los ejemplos específicos incluyen levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, y hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*.

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

55 El polipéptido codificado por un gen de interés puede obtenerse mediante la transformación de estas células con el gen de interés y el cultivo de las células transformadas *in vitro*. El cultivo puede realizarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, como caldo de cultivo para células animales, puede usarse un medio tal como DMEM, MEM, RPMI1640 o IMDM. Puede usarse conjuntamente un suplemento de suero tal como suero de ternero fetal (FCS). Alternativamente, puede realizarse cultivo libre de suero. El pH durante el cultivo es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8. El cultivo se realiza habitualmente a aproximadamente 30-40°C durante aproximadamente 15-200 horas. Si es necesario, se llevan a cabo la sustitución del medio, aireación y agitación.

Por otra parte, los sistemas de producción *in vivo* incluyen los que usan animales o plantas. Un gen de interés se transfiere a estos animales o plantas para producir el polipéptido en los cuerpos de animales o cuerpos de plantas. Entonces, se recoge el polipéptido. El término "huésped" tal como se usa en el presente documento incluye tales animales o plantas.

- 5 Cuando se usan animales, los sistemas de producción disponibles incluyen los que usan mamíferos o insectos. Pueden usarse cabras, cerdos, ovejas, ratones y ganado como mamíferos (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Cuando se usan mamíferos, pueden usarse animales transgénicos.

10 En primer lugar, un gen de interés se fusiona a un gen que codifica un polipéptido producido de manera inherente en leche (tal como  $\beta$ -caseína de cabra) para preparar de ese modo un gen de fusión. Un fragmento de ADN que contiene este gen de fusión se inyecta en un embrión de cabra, que entonces se implanta en el útero de una cabra hembra. El polipéptido de interés puede obtenerse de la leche producida por cabras transgénicas nacidas de la cabra que aceptó el embrión o las crías de las cabras transgénicas. Para aumentar el rendimiento de leche que contiene el polipéptido producido por las cabras transgénicas, pueden administrarse de manera apropiada hormonas a las cabras transgénicas (Ebert, K. M. *et al.*, Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

- 15 Los ejemplos de insectos que pueden usarse incluyen el gusano de seda. En este caso, se infecta el gusano de seda con baculovirus que porta un gen transferido que codifica el polipéptido de interés. El polipéptido de interés puede obtenerse del líquido corporal del gusano de seda (Susumu, M. *et al.*, Nature (1985) 315, 592-594).

20 Además, cuando se usan plantas, puede usarse normalmente tabaco. Cuando se usa tabaco, un gen que codifica el polipéptido de interés se inserta en un vector de expresión de plantas (por ejemplo, pMON 530), que entonces se transfiere a una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Una planta de tabaco (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*) se infecta con la bacteria resultante. El polipéptido de interés puede obtenerse de las hojas de esta planta (Julian, K.-C. Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

25 El polipéptido así obtenido puede aislarse del interior de las células huésped o de su exterior (por ejemplo, medio), y purificarse para dar un polipéptido sustancialmente puro y homogéneo. El aislamiento y la purificación de polipéptidos puede realizarse usando métodos de aislamiento y purificación convencionales para polipéptidos, y no están limitados en modo alguno. Por ejemplo, pueden aislarse y purificarse polipéptidos mediante la selección y combinación apropiadas de diversas herramientas y técnicas, tales como columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación con sales, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización, etc.

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

35 Antes o después de la purificación, también es posible proporcionar modificaciones opcionales al polipéptido o retirar un péptido parcial del mismo haciendo reaccionar el polipéptido con una enzima de modificación de polipéptidos apropiada. Los ejemplos de tal enzima incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasa, proteína cinasa y glucosidasa.

40 En la presente invención, el concepto de "células a las que se ha transferido ADN" engloba no sólo células en las que se ha incorporado ADN exógeno mediante tecnología de recombinación genética, sino también células en las que se ha activado ADN endógeno mediante tecnología de activación génica (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO94/12650) de modo que se ha iniciado o aumentado la expresión de una proteína correspondiente al ADN endógeno o la transcripción del ADN.

#### 45 Ejemplos

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

50 [Ejemplo 1] Clonación de un gen de intercambiador aniónico de células hepáticas humanas (intercambiador aniónico 1, banda 3)

55 Usando un ADNc QUICK-Clone de hígado humano comercial (Clontech Laboratories, Inc.) como molde, se obtuvo un gen de intercambiador aniónico (AE1) derivado de hígado humano mediante un método de PCR. Se secuenció el gen así clonado para confirmar que codificaba AE1 en vista de su homología con un AE1 humano publicado. El gen de AE1 así obtenido tenía mutaciones en ocho sitios en la secuencia de 2733 bases (t263g, t357c, a645t, a672c, c951t, a2078g, t2195c, c2500t) y codificada para 911 aminoácidos incluyendo cuatro aminoácidos diferentes (L88R, E693G, V712A, H834Y). Sin embargo, debido a que se predijo que el producto obtenido mediante el gen era un

transportador que tenía 13 dominios transmembrana (figura 1), se usó el gen para modulación celular como gen de AE1 derivado de hígado humano.

[Ejemplo 2] Aumento en la cantidad de producción de anticuerpos mediante la introducción de un gen de intercambiador aniónico humano

5 Añadiendo una secuencia de Kozak al gen de AE1 humano obtenido mediante clonación por PCR en el ejemplo 1 (que a continuación en el presente documento se denomina AE1), se construyeron pHyg-AE1 (figura 2) y pPur-AE1 (figura 3) como plásmidos de expresión con promotor de CMV. Los plásmidos de expresión pHyg-AE1 o pHyg que no contenían el gen de AE1 (que se obtuvo introduciendo en primer lugar unidades de expresión de genes de resistencia a higromicina derivadas de pTK5 proporcionado por Clontech Laboratories, Inc. en plásmidos pSV2-dhfr (n.º de la ATCC 37146) y luego eliminando las unidades de expresión de dhfr de los plásmidos construidos) se introdujeron en células CHO productoras de anticuerpos anti-glicoproteína-3 como cepa parental (véase la publicación internacional WO 2006/006693) mediante electroporación. Entonces, se seleccionaron cepas que presentaban alta proliferación en cultivo estático en presencia de higromicina (200 µg/ml). Tras la amplificación, se preparó el ARN total de las cepas pHyg-AE1, y se seleccionaron cinco cepas que expresaban AE1 humano a altos niveles mediante un método TaqMan. Además, se realizó una comparación para la cantidad de producción de anticuerpos entre células transformadas con pHyg como control (cuatro cepas) y cuatro cepas de células transformadas con AE1 humano que proliferaban a un nivel equivalente al observado con control durante cultivo con agitación. Durante cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml en la condición de  $2 \times 10^5$  células/ml en una fase inicial, la cantidad de un anticuerpo anti-glicoproteína-3 producido por células transformadas con pHyg-AE1 (cuatro cepas) en el día 12 tras el inicio del cultivo con agitación fue significativamente mayor que la producida por células transformadas con pHyg (cuatro cepas) (prueba de la t:  $P < 0,05$ , figura 4).

Entonces, usando como cepa parental la cepa que expresa AE1 que produjo la mayor cantidad de un anticuerpo entre las cuatro cepas transformadas con pHyg-AE1, se introdujeron mediante electroporación pPur-CSAD o un plásmido de expresión de ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa (CSAD) que contenía un gen de resistencia a puomicina (figura 10, véase el ejemplo de referencia 2 descrito más adelante), pPur-ALT1 o un plásmido de expresión de alanina aminotransferasa (ALT1) que contenía un gen de resistencia a puomicina (figura 11, véase el ejemplo de referencia 4 descrito más adelante), y un plásmido de control pPur (pPUR, vector de expresión de resistencia a puomicina, proporcionado por Clontech Laboratories, Inc.). Entonces, se seleccionaron cepas que presentaban alta proliferación en cultivo estático en presencia de puomicina (6 µg/ml). Tras la amplificación, se preparó el ARN total de las cepas así seleccionadas. Entonces, se seleccionaron cepas que coexpresan AE1/CSAD (nueve cepas), cepas que coexpresan AE1/ALT1 (10 cepas) y cepas que coexpresan AE1/pPur (ocho cepas), que expresaban los genes recién introducidos a altos niveles, y se compararon para determinar la cantidad de producción de anticuerpos y la tasa de supervivencia. En cultivo semicontinuo en matraces de agitación de 50 ml en la condición de  $2 \times 10^5$  células/ml en una fase inicial, las cepas que coexpresan AE1/CSAD (nueve cepas) mostraron cantidades significativamente mayores de producción de anticuerpos anti-glicoproteína-3 (prueba de la t,  $P < 0,05$ , figura 5) y tasas de supervivencia significativamente mayores (prueba de la t,  $P < 0,01$ , figura 6) que la cepa que coexpresa AE1/pPur de control (ocho cepas) en el día 10 en la fase tardía del cultivo con agitación. Entre las tres clases de cepas que coexpresan, las cepas que coexpresan AE1/ALT1 (10 cepas) produjeron la mayor cantidad de un anticuerpo anti-glicoproteína-3, que fue significativamente mayor que la producida por las cepas que coexpresan AE1/pPur de control (ocho cepas) en el día 8 del cultivo semicontinuo con agitación (prueba de la t,  $P < 0,01$ , figura 7). Posteriormente, AA53, que produjo la mayor cantidad del anticuerpo (1497 mg/l/8 días) y expresaba ARNm de ALT1 al mayor nivel entre las cepas que coexpresan AE1/ALT1 (10 cepas) en el estudio que usaba el cultivo semicontinuo con agitación, se sometió a cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l ( $10 \times 10^5$  células/ml en una fase inicial). Entonces, se encontró que la cantidad del anticuerpo producido por AA53 en el día 7 del cultivo era de 1,9 g/l/7 días, revelando que AA53 podía producir anticuerpos con alto rendimiento en cultivo a corto plazo (figura 8). Considerando que TA41, que era una cepa que coexpresaba TauT/ALT1 que produjo 5,3 g/l de un anticuerpo en el día 21 del cultivo (véase el ejemplo de referencia 4 descrito más adelante), produjo 1,5 g/l de un anticuerpo en el día 7 del cultivo, AA53 tiene el potencial de producir una mayor cantidad de un anticuerpo en un corto tiempo que TA41, y por tanto, se considera que AA53 es adecuada para la producción práctica.

50 Los resultados anteriores muestran que pueden obtenerse células que pueden producir anticuerpos con alto rendimiento expresando fuertemente un intercambiador aniónico (AE1) artificialmente, y expresando fuertemente AE1 y CSAD o ALT1 simultáneamente.

Además, se mostró el efecto de expresar fuertemente AE1 mediante la construcción de una cepa que podía producir un anticuerpo anti-IL-6R usando una célula huésped que expresaba fuertemente AE1. En una célula huésped habitual DXB11, se introdujo pHyg-AE1 (figura 2) mediante electroporación. Entonces, se seleccionaron cepas que presentaban alta proliferación en cultivo estático en presencia de higromicina (200 µg/ml). Tras la amplificación, se establecieron células que expresaban AE1 humano a altos niveles como célula huésped AE1/DXB11 mediante un método TaqMan. Se introdujeron plásmidos de expresión de anticuerpos anti-IL-6R en las células huésped AE1/DXB11, y se obtuvo AE1-S08 mediante clonación de células individuales. AE1-S08 así obtenida podía producir con alto rendimiento un anticuerpo anti-IL-6R, y la cantidad de su producción en el día 14 de cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l ( $7 \times 10^5$  células/ml en una fase inicial) era de 3,0 g/l tal como se muestra en la figura 12. Se ha confirmado que AE1-S08 puede producir anticuerpos con alto rendimiento y las células huésped, AE1/DXB11, tanto

eran estables en una prueba de estabilidad realizada mediante subcultivo como mantenían la expresión de AE1 a altos niveles.

Los resultados anteriores sugieren que el efecto de introducción de un gen de AE1 actúa positivamente tanto antes como después de la introducción de un gen de anticuerpo.

5 La presente invención puede aplicarse a todos los tipos de células que pueden producir un polipéptido (preferiblemente un anticuerpo).

[Ejemplo de referencia 1] Clonación de genes de ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa (CSAD) y cisteína dioxigenasa, tipo I (CDO1) derivados de células CHO

10 Se extrajo el ARN total de células productoras de anticuerpos anti-receptor de IL-6 (una línea celular CHO DXB11 a la que se había transferido un gen de anticuerpo anti-receptor de IL-6) (publicación de patente japonesa no examinada n.º Hei 8-99902), y luego se sintetizó ADNc a partir del mismo de manera dependiente de poli(A). Se obtuvieron genes de CSAD y CDO1 de hámster mediante PCR usando como molde el ADNc fragmentado con tres enzimas de restricción, Sall, XhoI y EcoRI. Como cebadores de PCR, se diseñaron los que contenían la secuencia de extremo 5' y de extremo 3' conservada entre CSAD o CDO1 de rata y ratón. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los genes clonados. A partir de su homología con otros genes de CSAD o CDO1 de especies conocidas, se confirmó que el gen clonado codificaba para CASD de hámster (figura 9). La secuencia de aminoácidos de CSAD de hámster tiene alta homología con las secuencias de aminoácidos conocidas de CSAD de ratón (identidad del 96%), CSAD de rata (identidad del 96%) y CSAD de ser humano (identidad del 91%); se predijo que CSAD de hámster es una enzima que tiene la misma actividad. La secuencia de nucleótidos de CSAD de hámster se muestra en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de CSAD de hámster se muestra en SEQ ID NO: 4.

[Ejemplo de referencia 2] Construcción de un plásmido que expresa CSAD de hámster para selección con puromicina

25 Añadiendo una secuencia de Kozak al gen de CSAD de hámster (que se denomina a continuación en el presente documento CSAD) obtenido mediante clonación por PCR en el ejemplo de referencia 1, se construyó un plásmido de expresión con promotor de CMV pPur/CSAD (figura 10).

[Ejemplo de referencia 3] Clonación de gen de alanina aminotransferasa de células hepáticas humanas

30 Usando un ADNc QUICK-Clone de hígado humano comercial (Clontech Laboratories, Inc.) como molde, se obtuvo el gen de alanina aminotransferasa (ALT1) derivado de hígado humano mediante un método de PCR. Se secuenció el gen así clonado y se confirmó que codificaba para ALT1 basándose en su homología con ALT1 humana publicada. El gen de ALT1 así obtenido tenía mutaciones en cinco sitios en la secuencia de 1488 bases (c157a, a215g, c765t, t857c, t995a) y codificaba para 496 aminoácidos incluyendo cuatro aminoácidos diferentes (R53S, Q72R, F286S, M332K), pero esto se usó como clon de PCR de la ALT1 derivada de hígado humano para modulación celular.

35 [Ejemplo de referencia 4] Aumento en el rendimiento de anticuerpos mediante transferencia de alanina aminotransferasa humana

Añadiendo una secuencia de Kozak a la ALT1 humana obtenida mediante clonación en el ejemplo de referencia 3 (que a continuación en el presente documento se denomina ALT1), se construyó pPur-ALT1, que era un plásmido de expresión con promotor de CMV (figura 11). Los plásmidos de expresión pPur-ALT1 o pPur que no contenían el gen de ALT1 se introdujeron en células CHO productoras de anticuerpos anti-glipicano-3 como cepas parentales (véase la publicación internacional WO 2006/006693) mediante electroporación, y se seleccionaron cepas de células que presentaban alta proliferación en cultivo estático en presencia de puromicina (6 µg/ml) (pPur-ALT1: siete cepas, pPur: tres cepas). Tras la expansión, se preparó el ARN total de las cepas de células con pPur-ALT1, y se seleccionaron seis cepas que expresaban ALT1 humana a altos niveles mediante un método TaqMan. Además, se realizó una comparación para el rendimiento de anticuerpos entre células con pPur transferido como control (tres cepas) y cuatro cepas de células con ALT1 humana transferida que proliferaban a un nivel equivalente al observado con las células con pPur transferido durante el cultivo con agitación. Durante el cultivo semicontinuo en un matraz de agitación de 50 ml con una densidad de células inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml, el rendimiento de anticuerpos anti-glipicano-3 de células con pPur-ALT1 transferido (cuatro cepas,  $1236 \pm 149$  mg/l) en el día 17 en la fase tardía del cultivo con agitación fue significativamente mayor que el de células con pPur transferido (tres cepas,  $871 \pm 119$  mg/l) (prueba de la t:  $p < 0,01$ ). Se encontró que A72, una cepa que expresa pPur-ALT1, y P41, una cepa que expresa pPur, producían cada una la mayor cantidad de un anticuerpo en el estudio usando cultivo semicontinuo con agitación, y se sometieron a cultivo semicontinuo en recipientes de 1 l (una densidad de células inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml). Como resultado, el rendimiento de anticuerpos de A72 era de 2,9 g/l en el día 19 del cultivo, que era mayor que el rendimiento de anticuerpos de P41 (2,2 g/l). Puesto que no se observó ningún aumento en el rendimiento de anticuerpos de P41 en el día 14 o días posteriores tras el inicio del cultivo, se consideró que la producción con alto rendimiento de un anticuerpo por A72 podía atribuirse al efecto de mantenimiento de la tasa de supervivencia (las tasas de supervivencia de la cepa que expresa pPur-ALT1 A72 y la cepa que expresa pPur P41

eran del 60% y el 23%, respectivamente, en el día 14 del cultivo).

Entonces, se transfirió conjuntamente pPur-ALT1 o pPur a T10 que era una célula con pHyg-TauT transferido como cepa parental (véase el ejemplo de referencia 6 descrito más adelante). Se seleccionaron células que coexpresaban TauT/ALT1 que presentaban alta proliferación y expresaban ALT1 humana a alto nivel (seis cepas) y células que coexpresaban TauT/pPur que presentaban alta proliferación (ocho cepas) y se sometieron a cultivo semicontinuo en matraces de agitación de 50 ml (una densidad de células inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml). El rendimiento de anticuerpos anti-glipicano-3 ( $745 \pm 87$  mg/l) de células que coexpresaban TauT/ALT1, que eran células que expresaban ALT, en el día 4 del cultivo con agitación fue significativamente mayor que el de células TauT/pPur ( $616 \pm 29$  mg/l) (prueba de la t:  $p < 0,01$ ).

Se sometió TA41, que era una cepa que coexpresaba TauT/ALT1 que produjo la mayor cantidad de un anticuerpo ( $881$  mg/l/4 días) y expresaba ARNm de ALT1 al mayor nivel en el estudio usando el cultivo semicontinuo con agitación, a cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l (una densidad de células inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml). Los rendimientos de anticuerpos eran de hasta  $1,3$  g/l en el día 7 del cultivo,  $3,0$  g/l en el día 10 del cultivo,  $3,5$  g/l en el día 12 del cultivo,  $4,6$  g/l en el día 17 del cultivo y  $5,3$  g/l en el día 21 del cultivo, que eran claramente mayores que los valores para TP08 ( $656$  mg/l/4 días), que era una cepa de control que produjo la mayor cantidad de un anticuerpo entre las cepas que coexpresan TauT/pPur ( $2,4$  g/l en el día 10 del cultivo).

[Ejemplo de referencia 5] Clonación del gen de transportador de taurina de hámster derivado de células CHO

Se extrajo el ARN total de células productoras de anticuerpos anti-receptor de IL-6 (una línea celular CHO DXB11 a la que se había transferido un gen de anticuerpos anti-receptor de IL-6) (publicación de patente japonesa no examinada n.º Hei 8-99902), y luego se sintetizó ADNc a partir del mismo de manera dependiente de poli(A). Se obtuvo el gen de transportador de taurina (TauT) de hámster mediante PCR usando como molde el ADNc fragmentado con tres enzimas de restricción, Sall, XhoI y EcoRI. Como cebadores de PCR, se diseñaron los que contenían la secuencia de extremo 5' y de extremo 3' conservada TauT de rata y ratón. Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen clonado. A partir de su homología con otros genes de TauT de especies conocidas, se confirmó que el gen clonado codificaba para TauT de hámster (figura 13). La secuencia de aminoácidos de TauT de hámster tiene alta homología con TauT de ratón (identidad del 96%), TauT de rata (identidad del 96%) y TauT de ser humano (identidad del 93%); se predijo que TauT de hámster es un transportador con 12 regiones transmembrana (figura 14).

[Ejemplo de referencia 6] Aumento en la densidad de células viables, inhibición de la producción de lactato y aumento en el rendimiento de anticuerpos, provocado por la transferencia de transportador de taurina de hámster

Se construyó el plásmido de expresión con promotor de CMV pHyg/TauT (figura 15) añadiendo una secuencia de Kozak al gen de TauT de hámster (a continuación en el presente documento, TauT) obtenido mediante clonación en el ejemplo de referencia 5. Se introdujo el plásmido de control pHyg sin gen de TauT o pHyg/TauT mediante electroporación en la célula CHO productora de anticuerpos anti-glipicano-3 de cepa parental (véase el documento WO 2006/006693). Tras la selección de células con plásmido de expresión transferido en presencia de higromicina ( $400$  µg/ml), se expandieron todas las cepas de células en crecimiento de manera estable (pHyg/TauT: 8 cepas; pHyg: 7 cepas). Se preparó ARNm de TauT. Posteriormente, se confirmó que 7 cepas expresaban TauT más fuertemente que la cepa parental mediante el método TaqMan; se seleccionaron como células con pHyg/TauT transferido. El nivel de expresión medio de ARNm de estas células en las que se realizó la transferencia (7 cepas) era aproximadamente 40 veces mayor que el control (7 cepas). Se sometieron células de las 14 cepas totales a cultivo discontinuo y cultivo semicontinuo en matraces de agitación de 50 ml con una densidad de células inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml. En el día 7 de cultivo (fase tardía), se compararon las densidades de células viables, los rendimientos de lactato y los rendimientos de anticuerpos anti-glipicano-3 en esas cepas. En cultivo discontinuo, se acumulan sustancias inhibitorias del crecimiento tales como lactato en el caldo de cultivo a medida que las células crecen y se inhibe su crecimiento. Sin embargo, las densidades de células viables ( $9,28 \pm 3,27 \times 10^5$  células/ml) y los rendimientos de lactato ( $1,54 \pm 0,20$  g/l) en células con pHyg/TauT transferido fueron superiores a los de células con pHyg transferido (densidades de células viables:  $5,69 \pm 2,09 \times 10^5$  células/ml, rendimientos de lactato:  $1,54 \pm 0,20$  g/l) (prueba de la t;  $p < 0,05$ ). Con respecto al rendimiento de anticuerpos anti-glipicano-3, 4 de las 7 cepas de células con pHyg/TauT transferido mostraron rendimientos de anticuerpos (rendimiento de anticuerpos medio:  $440,6$  mg/l) mayores que el mayor rendimiento en células con pHyg transferido ( $389,6$  mg/l). Además, puesto que la superioridad de células con pHyg/TauT transferido en el rendimiento de anticuerpos anti-glipicano-3 se hizo más evidente (prueba de la t;  $P < 0,01$ ) en cultivo semicontinuo, se sometieron la cepa T10 con pHyg/TauT transferido (que mostraba la mayor capacidad de crecimiento entre las 4 cepas anteriores) y la cepa parental a cultivo semicontinuo en un recipiente de 1 l. Como resultado, la razón viable de T10 se mantuvo al 80% o más incluso en el día 32 de cultivo, con producción de lactato inhibida. En consecuencia, su rendimiento de anticuerpos anti-glipicano-3 alcanzó  $2,9$  g/l en el día 35 de cultivo. Se confirmó mediante análisis de citometría de flujo que la célula T10 con TauT transferido estaba expresando moléculas de TauT en la membrana celular. Estos resultados sugieren que expresando artificialmente TauT de hámster, es posible elevar el potencial de células productoras de anticuerpos y crear cepas que pueden lograr una producción de anticuerpos potenciada.

## 60 Aplicabilidad industrial

La presente invención puede aplicarse a la producción de polipéptidos.

TEXTO LIBRE DE LISTA DE SECUENCIAS

<SEQ ID NO: 1>

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica AE1 humano (GenBank M27819).

5 <SEQ ID NO: 2>

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de AE1 humano (UniProtKB/Swiss-Prot P02730).

<SEQ ID NO: 3>

SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica CSAD de hámster.

<SEQ ID NO: 4>

10 SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de CSAD de hámster.

<SEQ ID NO: 5>

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica ALT1 humana (KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875).

<SEQ ID NO: 6>

15 SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de ALT1 humana (KEGG / ENZIMA: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (ser humano): 2875).

<SEQ ID NO: 7>

SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica transportador de taurina de hámster.

<SEQ ID NO: 8>

20 SEQ ID NO: V muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster.

**Lista de secuencias**

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Células para producir proteínas heterólogas y un método que usa las mismas

<130> FP-118PCT

25 <150> Documento JP P2007-276182

<151> 24-10-2008

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

30 <211> 2736

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 548 294 T3

atggaggagc tgcaggatga ttatgaagac atgatggagg agaactctgga gcaggaggaa	60
tatgaagacc cagacatccc cgagtcccag atggaggagc cggcagctca cgacaccgag	120
gcaacagcca cagactacca caccacatca caccgggta cccacaaggt ctatgtggag	180
ctgcaggagc tggatgatgga cgaaaagaac caggagctga gatggatgga ggcggcgcgc	240
tgggtgcaac tggaggagaa cctgggggag aatggggcct ggggcccgcc gcacctctct	300
cacctcacct tctggagcct cctagagctg cgtagagtct tcaccaaggg tactgttctc	360
ctagacctgc aagagacctc cctggctgga gtggccaacc aactgctaga caggtttatc	420
tttgaagacc agatccggcc tcaggaccga gaggagctgc tccgggccct gctgcttaa	480
cacagccacg ctggagagct ggaggccctg gggggtgtga agcctgcagt cctgacacgc	540
tctggggatc cttcacagcc tctgctcccc caacactcct cactggagac acagctcttc	600
tgtgagcagg gagatggggg cacagaaggg cactcacat ctggaattct ggaaaagatt	660
cccccgatt cagaggccac gttggtgcta gtgggccgcg ccgacttcct ggagcagccg	720
gtgctgggct tcgtgaggct gcaggaggca gcggagctgg aggcggtgga gctgccggtg	780
cctatacgtc tcctctttgt gttgctggga cctgaggccc cccacatcga ttacaccag	840
cttggccggg ctgctgccac cctcatgtca gagagggtgt tccgcataga tgctacatg	900
gctcagagcc gaggggagct gctgcactcc ctagagggct tcctggactg cagcctagtg	960
ctgcctccca ccgatgcccc ctccgagcag gcaactgctca gtctggtgcc tgtgcagagg	1020
gagctacttc gaaggcgcta tcagtccagc cctgccaaagc cagactccag cttctacaag	1080
ggcctagact taaatggggg cccagatgac cctctgcagc agacaggcca gctcttcggg	1140
ggcctggtgc gtgatatccg gcgccgtac ccctattacc tgagtgacat cacagatgca	1200
ttcagcccc aggtcctggc tgccgtcacc ttcactact ttgctgcact gtcaccgcc	1260

ES 2 548 294 T3

atcaccttcg gcggcctcct gggagaaaag acccggaacc agatgggagt gtcggagctg 1320  
 ctgatctcca ctgcagtgca gggcattctc ttcgccctgc tgggggctca gcccttgctt 1380  
 gtggtcggct tctcaggacc cctgctggtg tttgaggaag ccttcttctc gttctgcgag 1440  
 accaacggtc tagagtacat cgtgggcccgc gtgtggatcg gcttctggct catcctgctg 1500  
 gtggtggttg tgggtggcctt cgagggtagc ttcctggctc gcttcatctc ccgctatacc 1560  
 caggagatct tctccttctc catttccctc atcttcatct atgagacttt ctccaagctg 1620  
 atcaagatct tccaggacca cccactacag aagacttata actacaacgt gttgatggtg 1680  
 cccaaacctc agggccccct gcccaacaca gccctcctct cccttgtgct catggccggt 1740  
 accttcttct ttgccatgat gctgocgaag ttcaagaaca gctcctatth ccctggcaag 1800  
 ctgcgtcggg tcatcgggga cttcggggtc cccatctcca tcctgatcat ggtcctggtg 1860  
 gatttcttca ttcaggatac ctacaccag aaactctcgg tgcctgatgg cttcaaggtg 1920  
 tccaactcct cagccccggg ctgggtcacc caccactgg gcttgcgttc cgagtttccc 1980  
 atctggatga tgtttgcctc cgccctgctt gctctgctgg tcttcatcct catattcctg 2040  
 gagtctcaga tcaccacgct gattgtcagc aaacctgagc gcaagatggt caagggtcct 2100  
 ggcttccacc tggacctgct gctggtagta ggcctgggtg ggggtggcccgc cctctttggg 2160  
 atgccctggc tcagtgccac caccgtgcgt tccgtcacc atgccaacgc cctcactgtc 2220  
 atgggcaaaag ccagcaccce aggggctgca gccagatcc aggaggtcaa agagcagcgg 2280  
 atcagtggac tcctggctgc tgtgcttgtg ggcctgtcca tcctcatgga gcccatcctg 2340  
 tcccgcattc ccctggctgt actgtttggc atcttctctc acatgggggt cacgtcgtctc 2400  
 agcggcatcc agctctttga ccgcatcttg cttctgttca agccacccaa gtatcaccca 2460  
 gatgtgccct acgtcaagcg ggtgaagacc tggcgcagtc acttattcac gggcatccag 2520  
 atcatctgcc tggcagtgct gtgggtggtg aagtccacgc cggcctccct ggccctgccc 2580  
 ttcgtcctca tcctcactgt gccgctgcgg cgcgtcctgc tgccgctcat cttcaggaac 2640  
 gtggagcttc agtgtctgga tgctgatgat gccaaaggcaa cctttgatga ggaggaaggt 2700  
 cgggatgaat acgacgaagt ggccatgcct gtgtga 2736

<210> 2

<211> 911

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 548 294 T3

Met Glu Glu Leu Gln Asp Asp Tyr Glu Asp Met Met Glu Glu Asn Leu  
1                   5                   10                   15

Glu Gln Glu Glu Tyr Glu Asp Pro Asp Ile Pro Glu Ser Gln Met Glu



ES 2 548 294 T3

Ala Pro His Ile Asp Tyr Thr Gln Leu Gly Arg Ala Ala Ala Thr Leu  
 275 280 285

Met Ser Glu Arg Val Phe Arg Ile Asp Ala Tyr Met Ala Gln Ser Arg  
 290 295 300

Gly Glu Leu Leu His Ser Leu Glu Gly Phe Leu Asp Cys Ser Leu Val  
 305 310 315 320

Leu Pro Pro Thr Asp Ala Pro Ser Glu Gln Ala Leu Leu Ser Leu Val  
 325 330 335

Pro Val Gln Arg Glu Leu Leu Arg Arg Arg Tyr Gln Ser Ser Pro Ala  
 340 345 350

Lys Pro Asp Ser Ser Phe Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Asn Gly Gly Pro  
 355 360 365

Asp Asp Pro Leu Gln Gln Thr Gly Gln Leu Phe Gly Gly Leu Val Arg  
 370 375 380

Asp Ile Arg Arg Arg Tyr Pro Tyr Tyr Leu Ser Asp Ile Thr Asp Ala  
 385 390 395 400

Phe Ser Pro Gln Val Leu Ala Ala Val Ile Phe Ile Tyr Phe Ala Ala  
 405 410 415

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

Asn Gln Met Gly Val Ser Glu Leu Leu Ile Ser Thr Ala Val Gln Gly  
 435 440 445

Ile Leu Phe Ala Leu Leu Gly Ala Gln Pro Leu Leu Val Val Gly Phe  
 450 455 460

Ser Gly Pro Leu Leu Val Phe Glu Glu Ala Phe Phe Ser Phe Cys Glu  
 465 470 475 480

Thr Asn Gly Leu Glu Tyr Ile Val Gly Arg Val Trp Ile Gly Phe Trp  
 485 490 495

Leu Ile Leu Leu Val Val Leu Val Val Ala Phe Glu Gly Ser Phe Leu  
 500 505 510

Val Arg Phe Ile Ser Arg Tyr Thr Gln Glu Ile Phe Ser Phe Leu Ile  
 515 520 525

ES 2 548 294 T3

Ser Leu Ile Phe Ile Tyr Glu Thr Phe Ser Lys Leu Ile Lys Ile Phe  
530 535 540

Gln Asp His Pro Leu Gln Lys Thr Tyr Asn Tyr Asn Val Leu Met Val  
545 550 555 560

Pro Lys Pro Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Ala Leu Leu Ser Leu Val  
565 570 575

Leu Met Ala Gly Thr Phe Phe Phe Ala Met Met Leu Arg Lys Phe Lys  
580 585 590

Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Gly Lys Leu Arg Arg Val Ile Gly Asp Phe  
595 600 605

Gly Val Pro Ile Ser Ile Leu Ile Met Val Leu Val Asp Phe Phe Ile  
610 615 620

Gln Asp Thr Tyr Thr Gln Lys Leu Ser Val Pro Asp Gly Phe Lys Val  
625 630 635 640

Ser Asn Ser Ser Ala Arg Gly Trp Val Ile His Pro Leu Gly Leu Arg  
645 650 655

Ser Glu Phe Pro Ile Trp Met Met Phe Ala Ser Ala Leu Pro Ala Leu  
660 665 670

Leu Val Phe Ile Leu Ile Phe Leu Glu Ser Gln Ile Thr Thr Leu Ile  
675 680 685

Val Ser Lys Pro Glu Arg Lys Met Val Lys Gly Ser Gly Phe His Leu  
690 695 700

Asp Leu Leu Leu Val Val Gly Met Gly Gly Val Ala Ala Leu Phe Gly  
705 710 715 720

Met Pro Trp Leu Ser Ala Thr Thr Val Arg Ser Val Thr His Ala Asn  
725 730 735

Ala Leu Thr Val Met Gly Lys Ala Ser Thr Pro Gly Ala Ala Ala Gln  
740 745 750

Ile Gln Glu Val Lys Glu Gln Arg Ile Ser Gly Leu Leu Val Ala Val  
755 760 765

Leu Val Gly Leu Ser Ile Leu Met Glu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Pro  
770 775 780

ES 2 548 294 T3

Leu Ala Val Leu Phe Gly Ile Phe Leu Tyr Met Gly Val Thr Ser Leu  
785 790 795 800

Ser Gly Ile Gln Leu Phe Asp Arg Ile Leu Leu Leu Phe Lys Pro Pro  
805 810 815

Lys Tyr His Pro Asp Val Pro Tyr Val Lys Arg Val Lys Thr Trp Arg  
820 825 830

Met His Leu Phe Thr Gly Ile Gln Ile Ile Cys Leu Ala Val Leu Trp  
835 840 845

Val Val Lys Ser Thr Pro Ala Ser Leu Ala Leu Pro Phe Val Leu Ile  
850 855 860

Leu Thr Val Pro Leu Arg Arg Val Leu Leu Pro Leu Ile Phe Arg Asn  
865 870 875 880

Val Glu Leu Gln Cys Leu Asp Ala Asp Ala Lys Ala Thr Phe Asp  
885 890 895

Glu Glu Glu Gly Arg Asp Glu Tyr Asp Glu Val Ala Met Pro Val  
900 905 910

<210> 3

<211> 1482

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

ES 2 548 294 T3

atggctgact caaaaccact caatgccctg gatggggacc ctgtggctgt ggagtcctta 60  
 ctccgggatg tgtttgggat tgttgtagat gaggccattc ggaaagggac cagtgcctcg 120  
 gagaaggttt gtgaatggaa ggagcctgaa gagctcaagc atctgctgga tttggagctg 180  
 cagagccagg gcgagtctca agagcagatt ctagagcgcct gccgggctgt gattcactac 240  
 agtgtcaaga ctggtcaccc ccggttcttc aaccagctct tctcaggggt agacccccat 300  
 gctctggctg ggcgcatcat cacagaaagc ctcaacacca gccagtacac atatgagatt 360  
 gcccctgtgt ttgtcctcat ggaagaggag gtgctgaaga aactccgtgc cctggtgggc 420  
 tggaaactctg gggatggggt cttctgtctt ggtggctcca tctcgaacat gtatgccatg 480  
 aacctggccc gctatcagcg ctaccagac tgcaagcaaa gaggcctccg ggccctgccg 540  
 cccttggtc tcttcacttc aaaggagtgt cactactcca tcagtaaggg agctgctttt 600  
 ctgggacttg gcactgacag tgtccgagtg gtcaaggctg atgagagagg gaaaatgatc 660  
 cctgaggatc tggagaggca gatcagtctg gctgaggcag agggctctgt gccatttctg 720  
 gtcagtacca cctctggtac caccgtgcta ggggcctttg accccctgga tgcaattgct 780  
 gatgtttgcc agcgtcacgg attatggta cacgtggatg ccgcctgggg tgggagcgtc 840  
 ctgctgtccc ggacacacag gcatctcctg gatgggatcc agagggtga ctctgtggcc 900  
 tggaaacctc acaagcttct cgggtgcaggg ctgcagtgct ctgctcttct tctccgggac 960  
 acctcgaacc tgctcaagcg ctgccatggg tcccaggcca gctacctgtt ccagcaggac 1020  
 aaattctatg acgtggctct tgacactgga gacaaggtgg tgcaagtgtg ccgccgtgtg 1080  
 gactgtctga agttgtggct catgtggaag gcacagggtg ggcaaggact ggagcggcgc 1140  
 atcgaccagg cctttgctct caccgggtac ctggtggagg agataaaaa gcgggaagga 1200  
 tttgagttgg tcatggagcc tgagtttgtc aatgtgtgct tctggtttgt gcctcccagc 1260  
 ctgccccgga agaaagagag tccagattac agcaaaaggc tgtctcaggt ggcgcctgta 1320  
 ctcaaggagc gcatggtgaa gaagggctcc atgatgattg gctaccagcc ccatgggacc 1380  
 cgggccaaact tcttccgat ggtggtggcc aacccccacac tgaccaggc tgatatagac 1440  
 ttccttctgg gcgagctgga gcgtctgggc caggacctgt ga 1482

<210> 4

<211> 493

5 <212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

ES 2 548 294 T3

Met Ala Asp Ser Lys Pro Leu Asn Ala Leu Asp Gly Asp Pro Val Ala  
 1 5 10 15

Val Glu Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe Gly Ile Val Val Asp Glu Ala  
 20 25 30

Ile Arg Lys Gly Thr Ser Ala Ser Glu Lys Val Cys Glu Trp Lys Glu  
 35 40 45

Pro Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Asp Leu Glu Leu Gln Ser Gln Gly  
 50 55 60

Glu Ser Gln Glu Gln Ile Leu Glu Arg Cys Arg Ala Val Ile His Tyr  
 65 70 75 80

Ser Val Lys Thr Gly His Pro Arg Phe Phe Asn Gln Leu Phe Ser Gly  
 85 90 95

Leu Asp Pro His Ala Leu Ala Gly Arg Ile Ile Thr Glu Ser Leu Asn  
 100 105 110

ES 2 548 294 T3

Thr Ser Gln Tyr Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Met Glu  
 115 120 125  
 Glu Glu Val Leu Lys Lys Leu Arg Ala Leu Val Gly Trp Asn Ser Gly  
 130 135 140  
 Asp Gly Val Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Ser Asn Met Tyr Ala Met  
 145 150 155 160  
 Asn Leu Ala Arg Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp Cys Lys Gln Arg Gly Leu  
 165 170 175  
 Arg Ala Leu Pro Pro Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Glu Cys His Tyr  
 180 185 190  
 Ser Ile Ser Lys Gly Ala Ala Phe Leu Gly Leu Gly Thr Asp Ser Val  
 195 200 205  
 Arg Val Val Lys Ala Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Glu Asp Leu  
 210 215 220  
 Glu Arg Gln Ile Ser Leu Ala Glu Ala Glu Gly Ser Val Pro Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Val Ser Thr Thr Ser Gly Thr Thr Val Leu Gly Ala Phe Asp Pro Leu  
 245 250 255  
 Asp Ala Ile Ala Asp Val Cys Gln Arg His Gly Leu Trp Leu His Val  
 260 265 270  
 Asp Ala Ala Trp Gly Gly Ser Val Leu Leu Ser Arg Thr His Arg His  
 275 280 285  
 Leu Leu Asp Gly Ile Gln Arg Ala Asp Ser Val Ala Trp Asn Pro His  
 290 295 300  
 Lys Leu Leu Gly Ala Gly Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Leu Arg Asp  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu  
 325 330 335  
 Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asp Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys  
 340 345 350  
 Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met  
 355 360 365

Trp Lys Ala Gln Gly Gly Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile Asp Gln Ala  
 370 375 380

Phe Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Glu Ile Lys Lys Arg Glu Gly  
 385 390 395 400

Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe  
 405 410 415

Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Lys  
 435 440 445

Gly Ser Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Ala Asn Phe  
 450 455 460

Phe Arg Met Val Val Ala Asn Pro Thr Leu Thr Gln Ala Asp Ile Asp  
 465 470 475 480

Phe Leu Leu Gly Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu  
 485 490

<210> 5

<211> 1491

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 548 294 T3

atggcctcga gcacaggtga ccggagccag gcggtgaggc atggactgag ggcgaaggtg 60  
 ctgacgctgg acggcatgaa cccgcgtgtg cggagagtgg agtacgcagt gcgtggcccc 120  
 atagtgcagc gagccttggg gctggagcag gagctgcgcc aggggtgtgaa gaagcctttc 180  
 accgaggtca tccgtgccaa catcggggac gcacaggcta tggggcagag gcccatacacc 240  
 ttcctgcgcc aggtccttggc cctctgtgtt aaccctgatc ttctgagcag ccccaacttc 300  
 cctgacgatg ccaagaaaag ggcggagcgc atcttgacag cgtgtggggg ccacagtctg 360  
 ggggcctaca gcgtcagctc cggcatccag ctgatccggg aggacgtggc gcggtacatt 420  
 gagaggcgtg acggaggcat ccctgcggac cccaacaacg tcttcctgtc cacaggggcc 480  
 agcgatgcca tcgtgacggg gctgaagctg ctggtggccg gcgagggcca cacacgcagc 540  
 ggtgtgetca tccccatccc ccagtaccca ctctactcgg ccacgctggc agagctgggc 600  
 gcagtgcagg tggattacta cctggacgag gagcgtgcct gggcgctgga cgtggccgag 660  
 cttcaccgtg cactgggcca ggcgcgtgac cactgccgcc ctctgtgcgt ctgtgtcatc 720  
 aaccctggca accccaccgg gcaggtgcag acccgcgagt gcatcgaggc cgtgatccgc 780  
 ttcgccttcg aagagcggct ctttctgctg gcggacgagg tgtaccagga caacgtgtac 840  
 gccgcgggtt cgcagttcca ctcatcaag aagggtgtca tggagatggg gccgccctac 900  
 gccgggcagc aggagcttgc ctccttccac tccacctcca agggctacat gggcgagtgc 960  
 gggttccgcg gcggctatgt ggaggtggtg aacatggacg ctgcagtgca gcagcagatg 1020  
 ctgaagctga tgagtgtgcg gctgtgcccg ccggtgccag gacaggccct gctggacctg 1080  
 gtggtcagcc cgcccgcgcc caccgacccc tcctttgctc agttccaggc tgagaagcag 1140  
 gcagtgctgg cagagctggc ggccaaggcc aagctcaccg agcaggtctt caatgaggct 1200  
 cctggcatca gctgcaaccc agtgcagggc gccatgtact cttcccgcg cgtgcagctg 1260  
 cccccgcggg cgggtggagc cgctcaggag ctgggcctgg cccccgatat gttcttctgc 1320  
 ctgcccctcc tggaggagac cggcatctgc gtggtgccag ggagcggctt tgggcagcgg 1380  
 gaaggcacct accacttccg gatgaccatt ctgccccct tggagaaact gcggctgctg 1440  
 ctggagaagc tgagcaggtt ccatgccaaag ttcaccctcg agtactcctg a 1491

<210> 6

<211> 992

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 548 294 T3

Met Ala Ser Ser Thr Gly Asp Arg Ser Gln Ala Val Arg His Gly Leu  
 1 5 10 15

Arg Ala Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Met Asn Pro Arg Val Arg Arg  
 20 25 30

Val Glu Tyr Ala Val Arg Gly Pro Ile Val Gln Arg Ala Leu Glu Leu  
 35 40 45

Glu Gln Glu Leu Arg Gln Gly Val Lys Lys Pro Phe Thr Glu Val Ile  
 50 55 60

Arg Ala Asn Ile Gly Asp Ala Gln Ala Met Gly Gln Arg Pro Ile Thr  
 65 70 75 80

Phe Leu Arg Gln Val Leu Ala Leu Cys Val Asn Pro Asp Leu Leu Ser  
 85 90 95

Ser Pro Asn Phe Pro Asp Asp Ala Lys Lys Arg Ala Glu Arg Ile Leu  
 100 105 110

Gln Ala Cys Gly Gly His Ser Leu Gly Ala Tyr Ser Val Ser Ser Gly



ES 2 548 294 T3

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

ES 2 548 294 T3

Ile Gln Leu Ile Arg Glu Asp Val Ala Arg Tyr Ile Glu Arg Arg Asp  
625 630 635 640

Gly Gly Ile Pro Ala Asp Pro Asn Asn Val Phe Leu Ser Thr Gly Ala  
645 650 655

Ser Asp Ala Ile Val Thr Val Leu Lys Leu Leu Val Ala Gly Glu Gly  
660 665 670

His Thr Arg Thr Gly Val Leu Ile Pro Ile Pro Gln Tyr Pro Leu Tyr  
675 680 685

Ser Ala Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ala Val Gln Val Asp Tyr Tyr Leu  
690 695 700

Asp Glu Glu Arg Ala Trp Ala Leu Asp Val Ala Glu Leu His Arg Ala  
705 710 715 720

Leu Gly Gln Ala Arg Asp His Cys Arg Pro Arg Ala Leu Cys Val Ile  
725 730 735

Asn Pro Gly Asn Pro Thr Gly Gln Val Gln Thr Arg Glu Cys Ile Glu  
740 745 750

Ala Val Ile Arg Phe Ala Phe Glu Glu Arg Leu Phe Leu Leu Ala Asp  
755 760 765

Glu Val Tyr Gln Asp Asn Val Tyr Ala Ala Gly Ser Gln Phe His Ser  
770 775 780

Phe Lys Lys Val Leu Met Glu Met Gly Pro Pro Tyr Ala Gly Gln Gln  
785 790 795 800

Glu Leu Ala Ser Phe His Ser Thr Ser Lys Gly Tyr Met Gly Glu Cys  
805 810 815

Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Val Glu Val Val Asn Met Asp Ala Ala Val  
820 825 830

Gln Gln Gln Met Leu Lys Leu Met Ser Val Arg Leu Cys Pro Pro Val  
835 840 845

Pro Gly Gln Ala Leu Leu Asp Leu Val Val Ser Pro Pro Ala Pro Thr  
850 855 860

Asp Pro Ser Phe Ala Gln Phe Gln Ala Glu Lys Gln Ala Val Leu Ala  
865 870 875 880

ES 2 548 294 T3

Glu Leu Ala Ala Lys Ala Lys Leu Thr Glu Gln Val Phe Asn Glu Ala  
 885 890 895

Pro Gly Ile Ser Cys Asn Pro Val Gln Gly Ala Met Tyr Ser Phe Pro  
 900 905 910

Arg Val Gln Leu Pro Pro Arg Ala Val Glu Arg Ala Gln Glu Leu Gly  
 915 920 925

Leu Ala Pro Asp Met Phe Phe Cys Leu Arg Leu Leu Glu Glu Thr Gly  
 930 935 940

Ile Cys Val Val Pro Gly Ser Gly Phe Gly Gln Arg Glu Gly Thr Tyr  
 945 950 955 960

His Phe Arg Met Thr Ile Leu Pro Pro Leu Glu Lys Leu Arg Leu Leu  
 965 970 975

Leu Glu Lys Leu Ser Arg Phe His Ala Lys Phe Thr Leu Glu Tyr Ser  
 980 985 990

<210> 7

<211> 1869

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 7

ES 2 548 294 T3

atggccacca	aggagaagct	gcagtgtctg	aaagacttcc	acaagacat	cctgaagcct	60
tctccagga	agagcccagg	cacacggcct	gaggatgagg	ctgaggggaa	gccccctcag	120
agggagaagt	ggtccagcaa	gattgacttt	gtgctgtctg	tggccggagg	cttcgtgggt	180
ttgggcaacg	tttggcgttt	cccgtacctc	tgctacaaaa	atggtggagg	tgctttcctc	240
ataccgtatt	ttattttcct	gtttgggagt	ggcctgcctg	tgtttttcct	ggaggtcata	300
ataggccagt	acacctcaga	agggggaatc	acctgctggg	agaagatctg	ccccttgttc	360
tctggcattg	gctacgcata	catcgtcctc	gtgtccctcc	tgaatgtgta	ctacattgtc	420
atcctggcct	gggccacata	ctacctatth	cactccttcc	agacagagct	tccctgggcc	480
cactgcaacc	acagctggaa	cacaccacat	tgcatggagg	acaccctgcg	taggaatgag	540
agtctctggg	tctcccttag	cgctccaac	ttcacctcgc	ctgtcatcga	gttctgggag	600
cgcaatgtac	tcagcctgtc	ttccggaatc	gacgaaccag	gcgctctgaa	atgggacctt	660
gcgctctgcc	tcctcttagt	ctggcttgtc	tgttttttct	gcatatggaa	gggtgttcga	720
tccacaggca	aggttgtcta	cttcaccgcc	actttcccgt	ttgccatgct	tctggtgctg	780
ctggtccgtg	gactgaccct	gccgggtgct	ggcgaaggca	tcaaattcta	cctgtaccct	840

ES 2 548 294 T3

gacatcagcc gccttgagga cccacaggtg tggatcgacg ccggaacca gatattcttt 900  
tcctatgcc tctgcctggg ggccatgacc tcaactggaa gctacaacaa gtacaagtat 960  
aactcgta gggactgtat gctgctggga tgcctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020  
ggcttcgcag ttttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080  
gatgtggctg agtcaggtcc tggcttggcc ttcattgcct atccaaaagc tgtgactatg 1140  
atgccgctgc ccaccttttg gtccattctg ttttttatta tgctcctctt gcttggactg 1200  
gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tggttgatct ttaccctgcc 1260  
ttcctaagga agggttatcg tcgggaagtc ttcactgcc tccctgtgtag catcagctac 1320  
ctgctggggc tgtcgatggt gacggagggg ggcatgtat tgtttcaact ctttgactac 1380  
tatgcagcta gtggtgtatg ctttttgtgg gttgcattct ttgaatgttt tgttattgcc 1440  
tggatatatg gtggtgataa cttatatgac ggtattgagg acatgattgg ctatcggcct 1500  
gggccctgga tgaagtacag ctgggctgtc atcaactccag ttctctgtgc tggatgtttc 1560  
atcttctctc ttgtcaagta tgtaccctg acctacaaca aagtctacgt gtatcctgat 1620  
tgggcaattg ggctgggctg gggcctggcc ctatcctcca tgggtgtgtat ccccttggtc 1680  
attgccatcc tcctctgccg gacggagggg ccgttccgcg tgagaatcca atacctgata 1740  
acccccaggg agcccaaccg ctgggctgtg gagcgtgagg gggccacacc cttccactcc 1800  
cgcacaagcc tcgtcatgaa cggcgcactc atgaaacca gtcacgtcat tgtggagacc 1860  
atgatgtga 1869  
<210> 8  
<211> 622  
<212> PRT  
5 <213> *Cricetulus griseus*  
<400> 8

ES 2 548 294 T3

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

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

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

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

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

ES 2 548 294 T3

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

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

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

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

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

His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Leu  
165 170 175

Arg Arg Asn Glu Ser Leu Trp Val Ser Leu Ser Ala Ser Asn Phe Thr  
180 185 190

Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Ser  
195 200 205

Gly Ile Asp Glu Pro Gly Ala Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu  
210 215 220

Leu Leu Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Trp Lys Gly Val Arg  
225 230 235 240

Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met  
245 250 255

Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Glu  
260 265 270

Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Glu Asp Pro  
275 280 285

Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser Tyr Ala Ile  
290 295 300

Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr  
305 310 315 320

Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys Leu Asn Ser Gly Thr

ES 2 548 294 T3

				325						330						335
Ser	Phe	Val	Ser	Gly	Phe	Ala	Val	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Phe	Met	Ala	
			340					345					350			
Gln	Glu	Gln	Gly	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	
		355					360					365				
Leu	Ala	Phe	Ile	Ala	Tyr	Pro	Lys	Ala	Val	Thr	Met	Met	Pro	Leu	Pro	
	370					375					380					
Thr	Phe	Trp	Ser	Ile	Leu	Phe	Phe	Ile	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	
385				390						395					400	
Asp	Ser	Gln	Phe	Val	Glu	Val	Glu	Gly	Gln	Ile	Thr	Ser	Leu	Val	Asp	
				405					410					415		
Leu	Tyr	Pro	Ser	Phe	Leu	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Arg	Glu	Val	Phe	Ile	
			420					425					430			
Ala	Ile	Leu	Cys	Ser	Ile	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Met	Val	Thr	
		435					440					445				
Glu	Gly	Gly	Met	Tyr	Val	Phe	Gln	Leu	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Ser	
	450					455					460					
Gly	Val	Cys	Leu	Leu	Trp	Val	Ala	Phe	Phe	Glu	Cys	Phe	Val	Ile	Ala	
465					470					475					480	
Trp	Ile	Tyr	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Asp	Gly	Ile	Glu	Asp	Met	Ile	
				485					490					495		
Gly	Tyr	Arg	Pro	Gly	Pro	Trp	Met	Lys	Tyr	Ser	Trp	Ala	Val	Ile	Thr	
			500					505					510			
Pro	Val	Leu	Cys	Ala	Gly	Cys	Phe	Ile	Phe	Ser	Leu	Val	Lys	Tyr	Val	
		515					520					525				
Pro	Leu	Thr	Tyr	Asn	Lys	Val	Tyr	Val	Tyr	Pro	Asp	Trp	Ala	Ile	Gly	
	530					535					540					
Leu	Gly	Trp	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Cys	Ile	Pro	Leu	Val	
545					550				555						560	
Ile	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Arg	Thr	Glu	Gly	Pro	Phe	Arg	Val	Arg	Ile	
				565					570					575		

ES 2 548 294 T3

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

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

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

## REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar una célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato y tiene un ADN transferido que codifica un anticuerpo y permitiendo de ese modo que la célula produzca dicho anticuerpo, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato es una célula a la que se ha transferido un ADN que codifica el transportador de bicarbonato.
2. Método de producción según la reivindicación 1, en el que la célula que expresa fuertemente un transportador de bicarbonato expresa además fuertemente ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa.
3. Método de producción según la reivindicación 1 ó 2, en el que el transportador de bicarbonato es un intercambiador aniónico SLC4 o un intercambiador aniónico SLC26.
4. Método de producción según la reivindicación 1 ó 2, en el que el transportador de bicarbonato es un intercambiador aniónico SLC4.
5. Método de producción según la reivindicación 4, en el que el intercambiador aniónico SLC4 es AE1.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula son células de ovario de hámster chino.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el ADN que codifica el intercambiador aniónico SLC4 es uno cualquiera de los siguientes (a) a (e):
  - (a) un ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2;
  - (b) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más residuos de aminoácido y aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;
  - (c) un ADN que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 50% o más con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 y que aún tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4;
  - (d) un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1;
  - (e) un ADN que se hibrida con un ADN complementario a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y aún codifica un polipéptido que tiene actividad de intercambiador aniónico SLC4.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho método se usa para producir un anticuerpo en la preparación de un producto farmacéutico.
9. Célula que tiene un ADN transferido que codifica un transportador de bicarbonato, y
  - (a) un ADN transferido que codifica un anticuerpo; y/o
  - (b) un ADN que codifica ácido cisteína-sulfínico descarboxilasa o alanina aminotransferasa.

Fig. 1

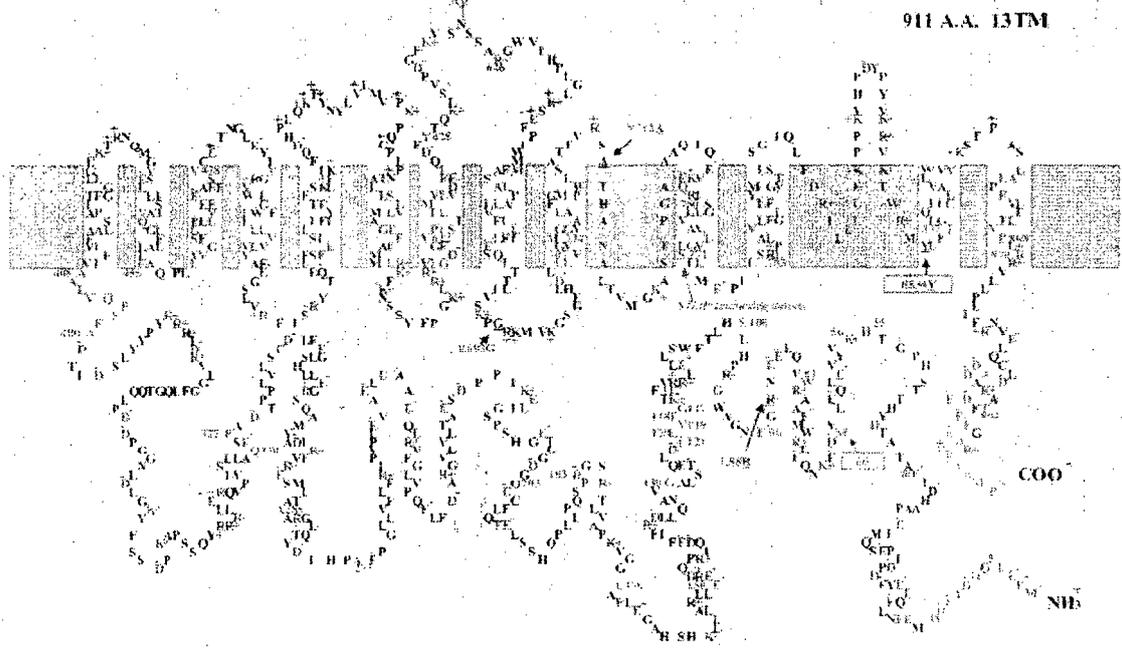


Fig. 2

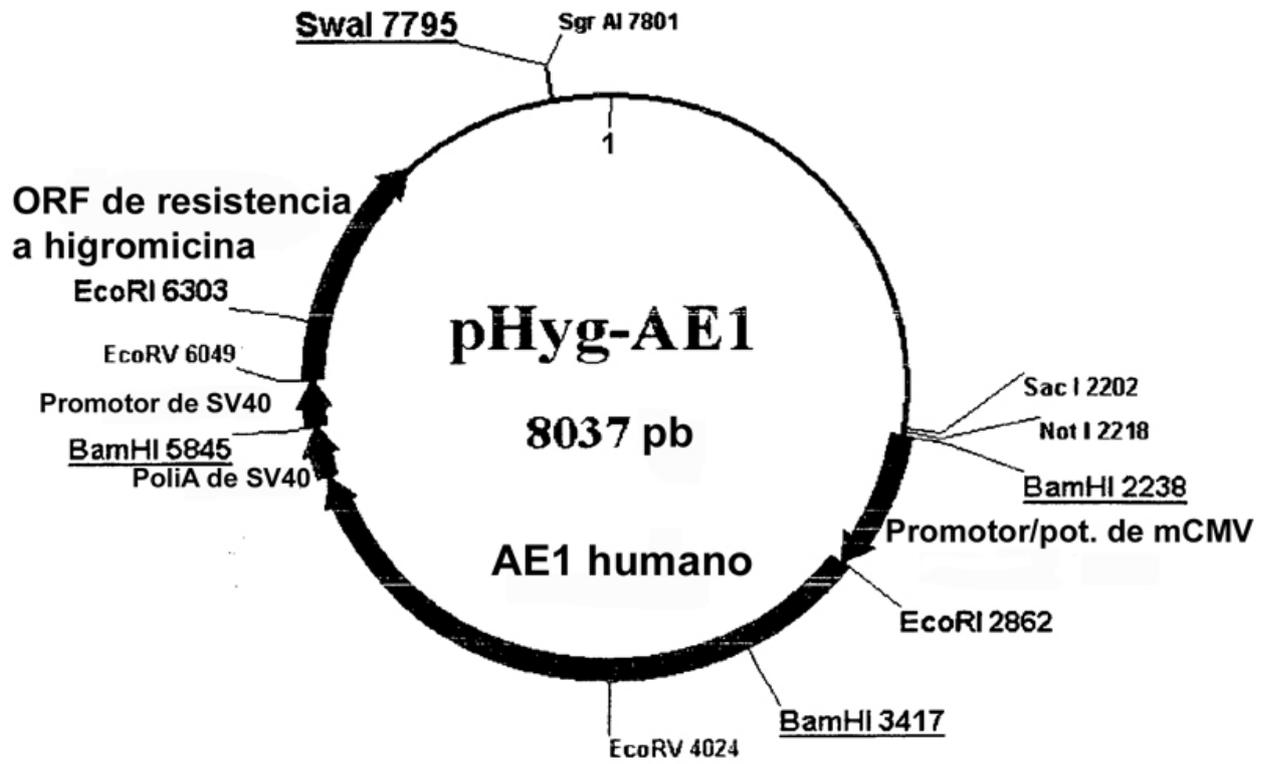


Fig. 3

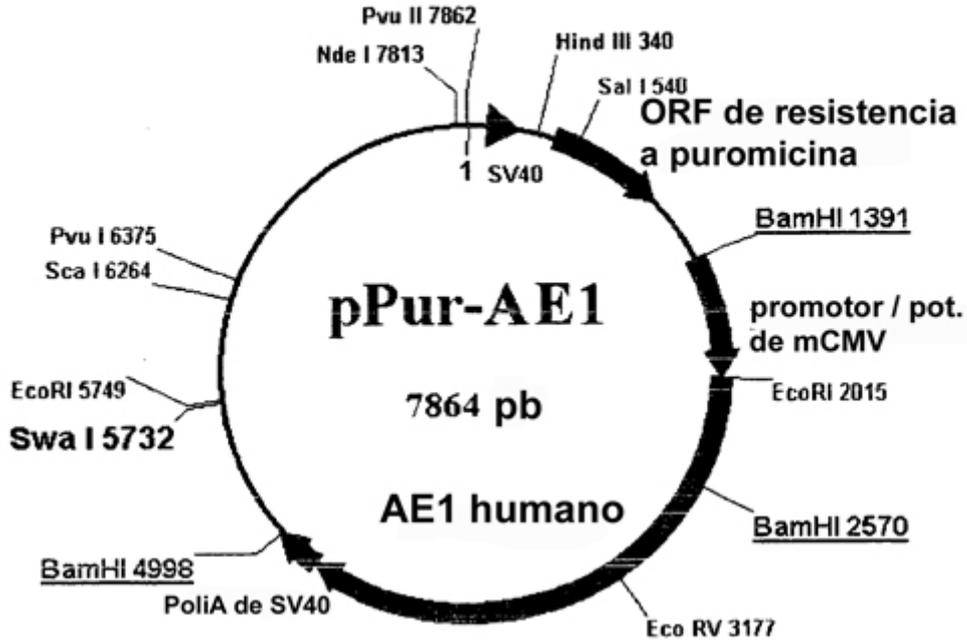


Fig. 4

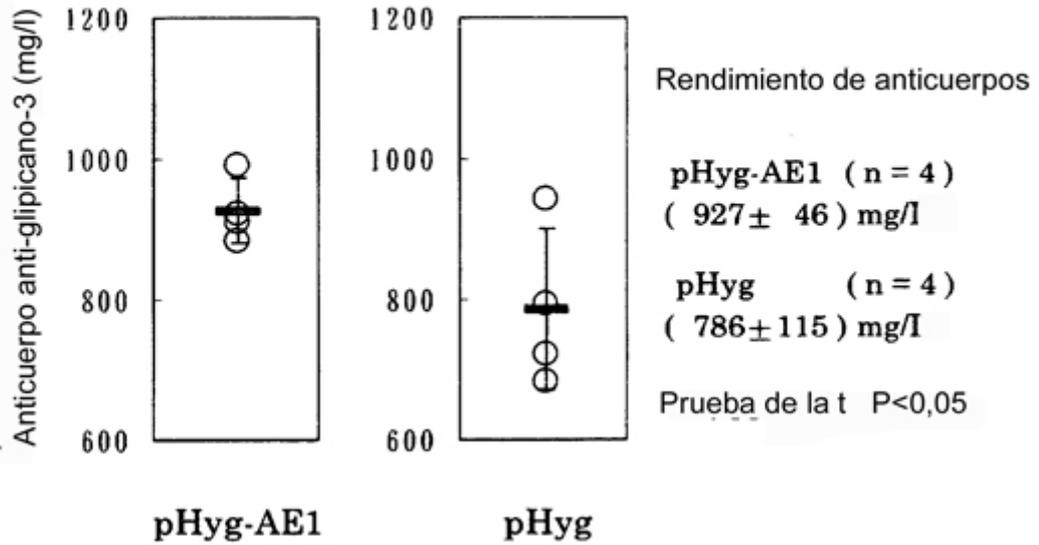
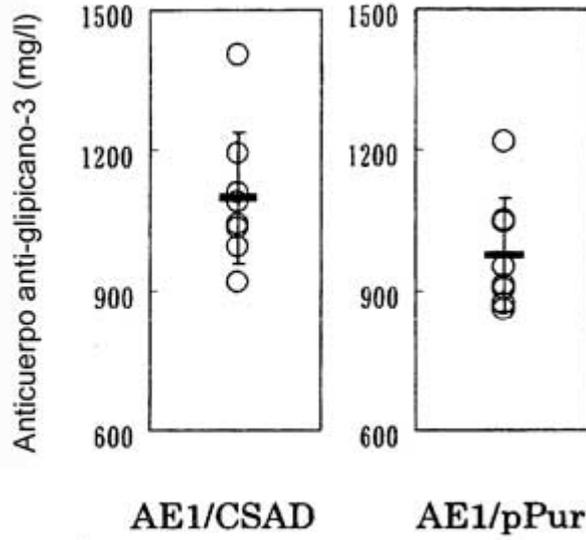


Fig. 5



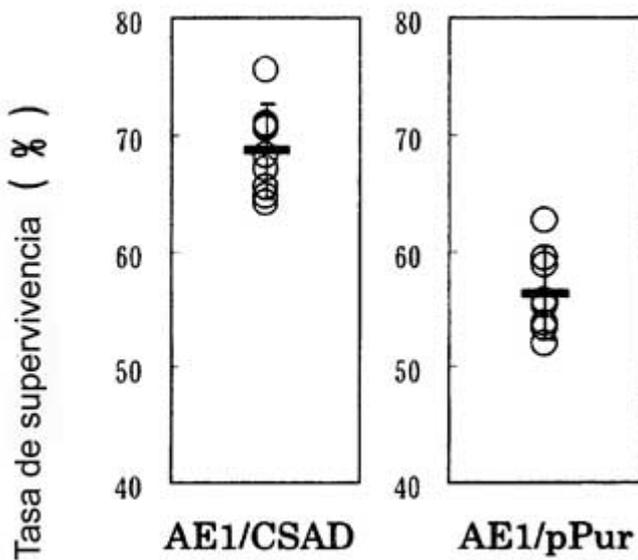
Rendimiento de anticuerpos

AE1/CSAD ( n = 9 )  
( 1098 ± 139 ) mg/l

AE1/pPur ( n = 8 )  
( 975 ± 122 ) mg/l

Prueba de la t P<0,05

Fig. 6



Tasa de supervivencia

AE1/CSAD ( n = 9 )  
( 69 ± 4 ) %

AE1/pPur ( n = 8 )  
( 56 ± 4 ) %

Prueba de la t P<0,01

Fig. 7

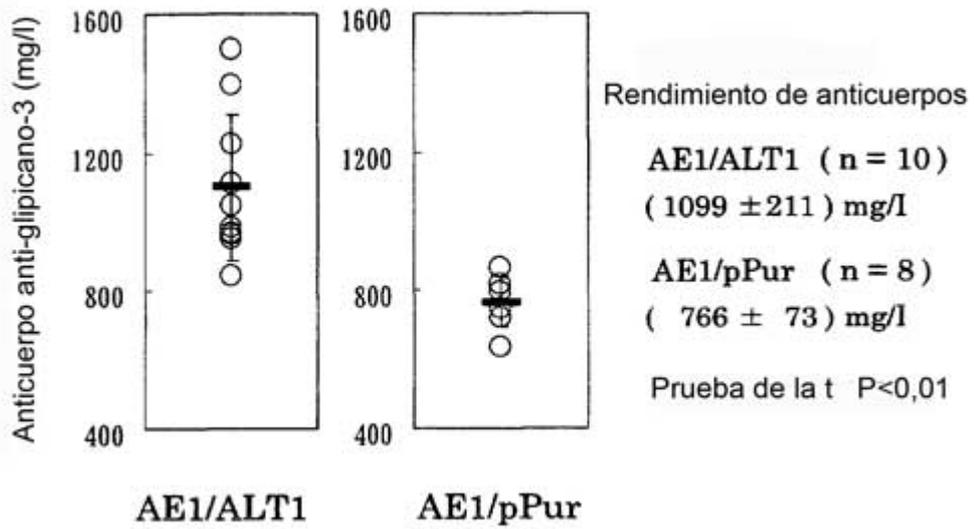


Fig. 8

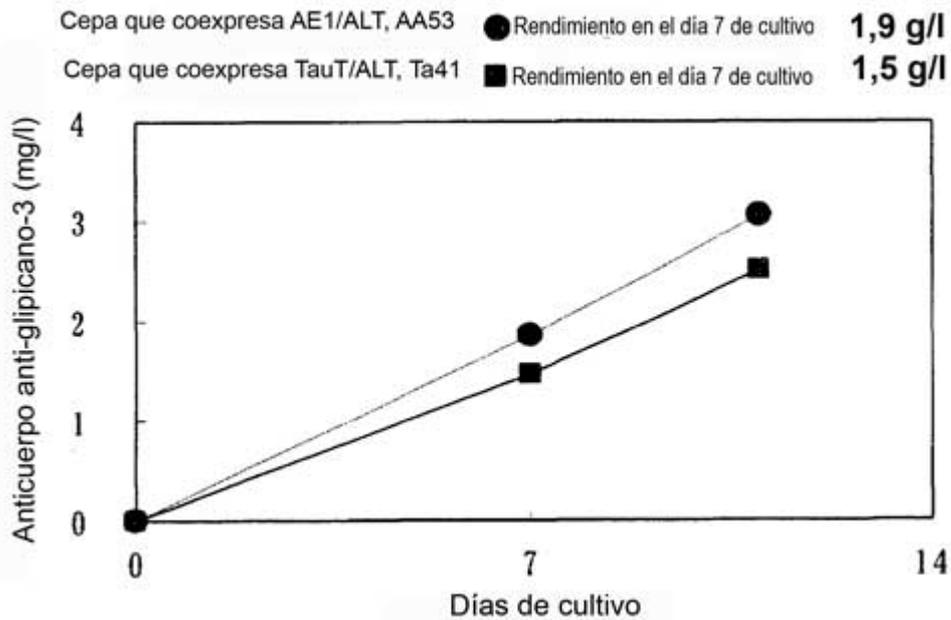




Fig. 11

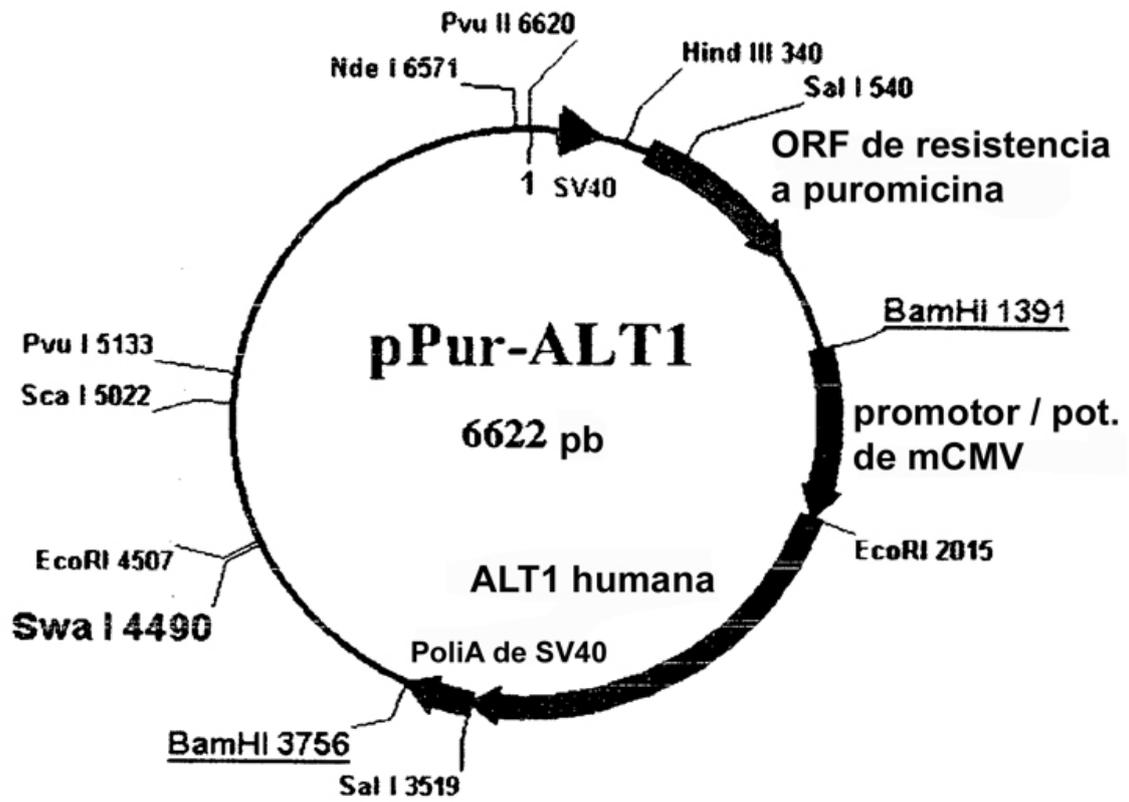




Fig. 14

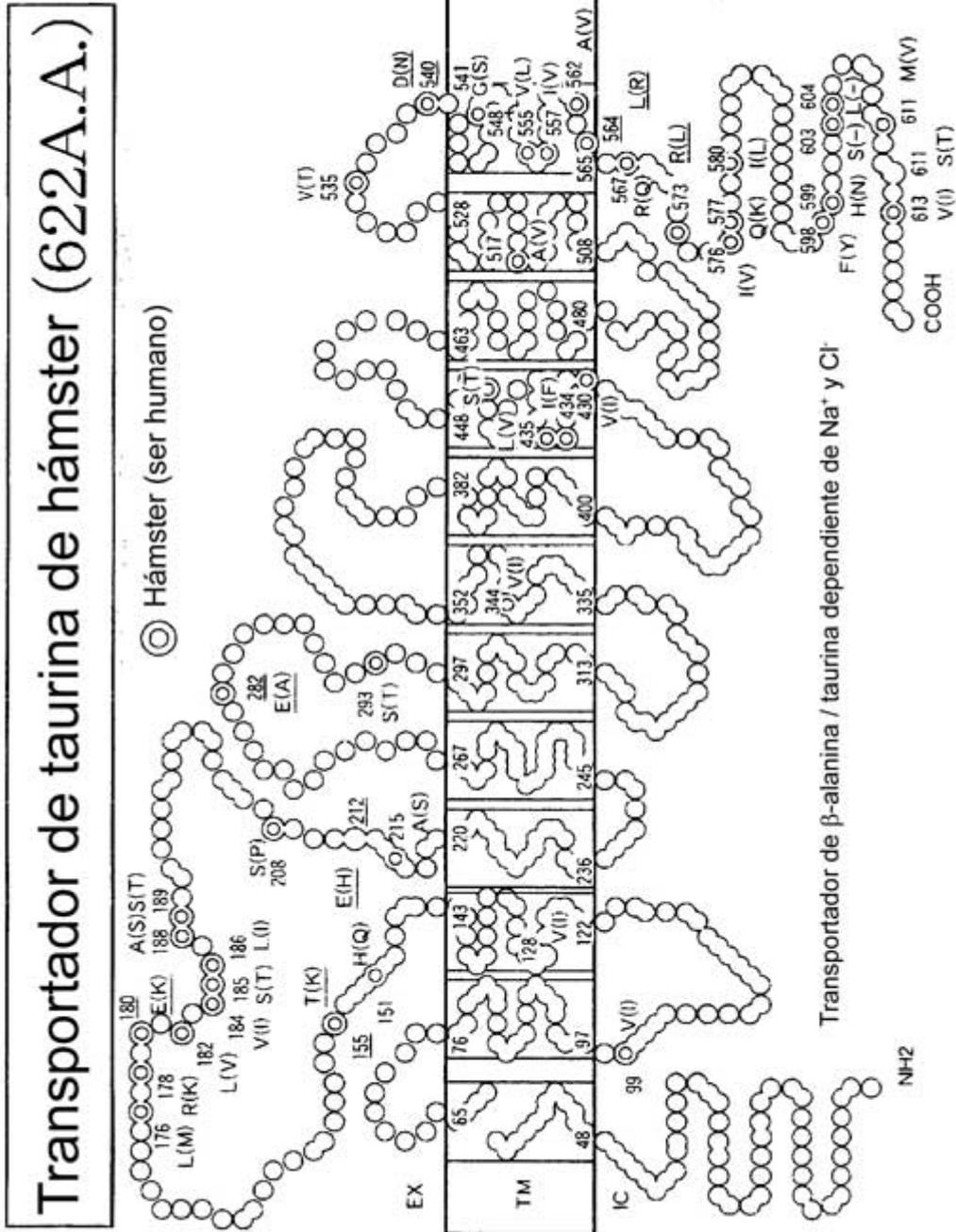


Fig. 15

